

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGIE

XX CICLO DOTTORATO DI RICERCA IN
TERAPIA PEDIATRICA E FARMACOLOGIA DELLO SVILUPPO

**Identificazione e caratterizzazione di un gene associato
all'asma ad insorgenza precoce persistente**

Coordinatore Scientifico: Prof. Renzo Galanello

Relatore:

Prof. Antonio Cao

Dottorando:

Dott.ssa Maria Antonietta Zuncheddu

Anno Accademico 2004 - 2007

INDICE

Premessa	1
1. Introduzione	2
1.1 Caratteristiche cliniche dell'asma	5
1.1.1. Epidemiologia	5
1.1.2. Definizione di asma	6
1.1.3. Sintomi	6
1.1.4. Diagnosi	7
1.1.5. Classificazione	8
1.1.6. Reazione infiammatoria nell'asma: ruolo dei linfociti T	9
1.1.7. Eziologia dell'asma	13
1.1.8. Fattori di rischio per l'insorgenza di asma	15
1.1.8.1. Fattori ambientali	15
1.1.8.2. Fattori individuali	17
1.1.8.3. Teoria dell'igiene	17
2. Genetica dell'asma allergico: stato dell'arte	18
2.1. Analisi di linkage	21
2.2. Studi di associazione	22
3. Obiettivo dello studio	24
4. Risultati	25
4.1. Analisi di linkage del cromosoma 12q13-24	25

4.2. Analisi di associazione	28
4.3. Replica dell'analisi di associazione in una popolazione indipendente	36
4.4. Analisi mutazionale del gene <i>IRAK-M</i>	39
4.5. Studi di espressione	42
5. Discussione	44
6. Conclusioni	48
7. Materiali e metodi	49
7.1. Campione	49
7.2. Il campione di replica	50
7.3. Aspetti Etici	50
7.4. Estrazione del DNA	50
7.5. Stima della concentrazione del DNA	51
7.6. Polimerase Chain Reaction (PCR)	51
7.7. Genotipizzazione dei marcatori microsatelliti	52
7.8. Analisi dei marcatori SNP	54
7.9. Analisi statistica	55
7.10. Analisi mutazionale	58
7.11. Immunoistochimica	58
Ringraziamenti	60
Bibliografia	61

Premessa

Questo studio ha l'obiettivo di comprendere le basi genetiche dell'asma utilizzando la popolazione sarda, che grazie alla ridotta eterogeneità genetica e condizioni ambientali omogenee facilita lo studio di patologie multifattoriali.

Nel corso degli ultimi 10 anni abbiamo collezionato numerose famiglie in cui almeno uno dei figli era affetto da asma allergico ed abbiamo condotto analisi di linkage e di associazione, sia attraverso il transmission disequilibrium test (TDT) che tramite uno studio caso-controllo, nella regione del cromosoma 12q13-24, già implicata nell'eziologia dell'asma in popolazioni indipendenti. L'analisi di linkage condotta su tale regione, stratificando il campione per età di esordio della malattia, ha rivelato valori significativi di LOD score con l'asma allergico. Sulla base di osservazioni cliniche che indicano diversità nell'asma prima e dopo la pubertà, abbiamo condotto l'analisi statistica stratificando la coorte in studio in base all'età di esordio della malattia, utilizzando come cut-off 13 anni. Tra i geni candidati per funzione presenti in questa regione ci siamo focalizzati su *IRAK-M* e abbiamo dimostrato che questo gene è associato all'asma persistente ad insorgenza precoce non solo nella nostra popolazione ma anche in una popolazione indipendente dell'Italia del nord, geneticamente distante dal campione sardo. L'analisi mutazionale delle regioni codificanti del gene *IRAK-M* condotta in 100 pazienti asmatici sardi ha rivelato mutazioni che non sono invece state trovate nei controlli sani. Inoltre mediante esperimenti di immunoistochimica abbiamo evidenziato l'espressione di *IRAK-M* nelle cellule epiteliali del polmone proponendo, anche sulla base di lavori precedenti, un ruolo importante di questa proteina nell'eziopatogenesi dell'asma.

1. Introduzione

L'asma è una malattia infiammatoria cronica delle vie respiratorie caratterizzata da ostruzione variabile delle vie aeree e sintomi quali: respiro fischiante, tosse, dispnea, senso di oppressione toracica, aumentata reattività bronchiale a diversi stimoli (NHLBI/WHO) (1). Questi sintomi sono in genere reversibili nel tempo spontaneamente o dopo terapia farmacologica.

L'asma rappresenta per prevalenza, incidenza, costi sociali, sanitari ed umani, una delle patologie più importanti non solo nell'ambito delle malattie respiratorie, ma delle patologie croniche in generale. E' presente in tutti i paesi, indipendentemente dal livello di sviluppo, sebbene la sua prevalenza vari in modo cospicuo tra paesi e tra popolazioni.. È documentato che nel corso degli ultimi 20 anni la sua incidenza sia aumentata considerevolmente, soprattutto nei bambini (2,3). La causa di tale aumento è al momento sconosciuta.

L'eziopatogenesi dell'asma, malattia caratterizzata da una considerevole eterogeneità sia nel fenotipo che nella fisiopatologia, non è ancora del tutto nota. Tuttavia, l'osservazione di aggregazione familiare e della diversa prevalenza della malattia in gruppi etnici diversi suggeriscono l'importanza della componente genetica. E' inoltre noto che l'infiammazione delle vie aeree è dovuta a processi immuno-mediati, ai quali prendono parte cellule infiammatorie e mediatori infiammatori, coinvolti nella causa della malattia. L'asma è considerata una malattia genetica complessa, dovuta all'interazione tra fattori genetici, che conferiscono la predisposizione alla comparsa dei sintomi, e fattori ambientali, quali allergeni, inquinanti atmosferici ed infezioni, che agiscono come fattori scatenanti la malattia. Lo studio delle malattie complesse come l'asma si è rivelato, malgrado i successi nell'identificazione dei geni dei disordini mendeliani, più difficile del

previsto. Le difficoltà sono legate fondamentalmente al fatto che la predisposizione ad ammalarsi nel caso delle patologie multifattoriali è, in genere, un tratto multigenico e che, di conseguenza, ciascuna delle mutazioni patogenetiche coinvolte ha un effetto modesto sul fenotipo (4). La bassa penetranza unita all'eterogeneità genica sono i due ostacoli principali nello studio della genetica di tali patologie.

Uno dei modi per semplificare lo studio dell'asma e delle altre malattie complesse è quello di analizzare una popolazione isolata e fondatrice in cui l'eterogeneità genetica ed ambientale sono ridotte e che nel corso dei secoli ha ricevuto influenze minime da parte di altre popolazioni (5). Pertanto la popolazione sarda, scelta per questo studio, rappresenta un modello ideale e una risorsa unica per l'identificazione dei geni di suscettibilità alle malattie complesse. La popolazione sarda attuale è di circa 1,6 milioni di abitanti, un numero sufficiente per avere una buona rappresentazione di tutte le patologie frequenti nel resto del mondo: in altre parole nell'isola sono presenti abbastanza casi di asma allergico, tumori, diabete ecc, per poter studiare la genetica di tali condizioni. Inoltre vi sono numerose evidenze della omogeneità genetica, in particolare per alcune fra le più importanti patologie monogeniche quali la talassemia, che mostrano la presenza di una singola mutazione del gene β -globinico (β^{o39}) nel 95% dei portatori (circa il 13% di tutta la popolazione) e negli individui affetti dalla malattia (6). Tale riduzione del numero di varianti alleliche si osserva anche in altre patologie mendeliane, quali il Morbo di Wilson (7).

In base ai reperti archeologici ritrovati nell'isola, si ipotizza che la Sardegna fosse abitata più di 10.000 anni fa. L'ipotesi più accreditata è che un numero limitato di individui (fondatori) abbia colonizzato la Sardegna e che tutti gli abitanti attuali derivino da essi. Il numero

ristretto di fondatori potrebbe aver contribuito alla riduzione del numero di geni di predisposizione e di varianti alleliche patogenetiche coinvolte nelle diverse patologie. Malgrado le invasioni e le dominazioni dell'isola, probabilmente non si sono avuti significativi flussi genetici nel corso dei millenni. Questo dato è dimostrato, per esempio, dall'osservazione che i più frequenti aplotipi dell'HLA di tipo II sono distribuiti in maniera uniforme in tutte le regioni dell'isola con un basso livello di differenziazione tra le regioni costiere e quelle più interne ed isolate. Le frequenze degli aplotipi riscontrati sono caratteristici della Sardegna e aplotipi comuni in altre popolazioni mediterranee risultano rari o addirittura assenti nell'isola. E questa è l'ulteriore dimostrazione della peculiarità genetica della popolazione sarda (8).

La Sardegna inoltre ha anche un'altra importante caratteristica che la rende vantaggiosa per gli studi genetici: le più importanti condizioni ambientali sono abbastanza omogenee in tutta l'isola. Il clima, le abitudini alimentari, per esempio, sono simili per tutti gli abitanti. Dato che la variabilità fenotipica dei tratti complessi è ovviamente legata anche alla variabilità ambientale, una riduzione di tale variabilità è sicuramente utile nello studio della componente ereditaria.

1.1. Caratteristiche cliniche dell'asma

1.1.1. Epidemiologia

L'asma è un problema mondiale ed un consistente onere sociale ed economico per i sistemi sanitari (9). Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità, ci sono tra i 100 e i 150 milioni di persone che soffrono di questa condizione in tutto il mondo. Le morti associate alla malattia, sempre secondo i dati dell'OMS, sono circa 180mila ogni anno.

Secondo la Global initiative for asthma (GINA), sono addirittura 300 milioni, fra cui 30 milioni in Europa le persone nel mondo che soffrono di asma, una ogni 20. La prevalenza totale stimata dell'asma è del 7,2% della popolazione mondiale (6% negli adulti, 10% nei bambini) ed è in aumento in entrambi (9). Vi possono comunque essere differenze fra la prevalenza dell'asma sia nei diversi paesi che tra differenti aree dello stesso paese, suggerendo che i vari fattori ambientali sono determinanti per la manifestazione della malattia.

In questi ultimi decenni nei Paesi sviluppati si è avuto inoltre un incremento dell'incidenza dell'asma e delle malattie allergiche (10). Nel 50% degli adulti e nell'80% dei bambini malati di asma, prevale la forma allergica, mediata dalla risposta dovuta alle IgE. L'asma allergico può insorgere a qualsiasi età ma l'incidenza è più alta nell'infanzia. Nei pazienti con asma ad esordio infantile frequentemente si osserva remissione durante l'adolescenza e talvolta una completa guarigione; l'asma ad esordio in età adulta tende a persistere per tutta la vita essendo in genere associato ad alterazioni anatomiche irreversibili (rimodellamento bronchiale) con riduzione delle funzioni polmonari.

1.1.2. Definizione di asma

La definizione corrente dell'American Thoracic Society (ATS) è la seguente: “L'asma è una ostruzione parziale del flusso aereo documentata da una variazione nella FEV1 o del picco di flusso espiratorio massimo di più del 20% spontaneamente o del 15% dopo stimolo farmacologico; inoltre è richiesta la presenza di sintomi cronici quale: tosse, fischio, dispnea” (1).

Una migliore conoscenza dei meccanismi che determinano l'insorgenza della malattia ha portato a una definizione più completa per cui l'asma è considerato un disordine infiammatorio cronico delle vie aeree in cui svolgono un ruolo diversi tipi cellulari, in particolare le mastcellule, gli eosinofili, i linfociti T, i macrofagi, i neutrofili e le cellule epiteliali delle vie respiratorie (11). Negli individui suscettibili questa infiammazione causa ricorrenti episodi di respiro sibilante, senso di costrizione toracica e tosse particolarmente la notte e al primo mattino. Questi episodi sono di solito associati con una estesa ma variabile ostruzione delle vie aeree che è spesso reversibile sia spontaneamente che dopo trattamento. Un importante aspetto che definisce l'asma comprende l'iperresponsività delle vie aeree e la broncoostruzione. L'iperresponsività delle vie aeree si riferisce ad una aumentata tendenza nelle vie aeree degli asmatici di reagire ad una varietà di stimoli che potrebbero non causare una risposta in vie aeree normali. La broncoostruzione si riferisce ad una contrazione delle vie aeree che limita il passaggio dell'aria. Anche la broncoostruzione è reversibile sia spontaneamente che dopo trattamento.

1.1.3. Sintomi

La presentazione clinica dell'asma è molto variabile da caso a caso, così come la gravità dei sintomi. I sintomi caratteristici dell'asma

sono: dispnea espiratoria, respiro sibilante, senso di costrizione toracica, indici di funzionalità respiratoria ridotti. L'asma può manifestarsi durante tutto l'arco dell'anno (in caso di allergia perenne o quando non sono riconoscibili fattori causali allergici) o prevalentemente nei periodi stagionali, in rapporto alla sensibilizzazione e all'esposizione allergenica o ad altri fattori scatenanti.

Due importanti caratteristiche dei sintomi dell'asma sono la variabilità e l'intermittenza: il paziente può infatti andare incontro a periodi di remissione clinica spontanei od in seguito alla terapia. La variabilità è condizionata dalla casualità dell'esposizione a fattori scatenanti.

Sintomi che compaiono dopo iperventilazione o esposizione ad aria fredda o ad altri irritanti, indicano la presenza di iperreattività bronchiale aspecifica ed indirizzano ad una diagnosi di asma. Nei bambini e nei giovani i sintomi si manifestano con frequenza dopo sforzo fisico (asma da sforzo).

1.1.4. Diagnosi

La diagnosi si fonda su 3 momenti principali: l'anamnesi, i test allergometrici e le prove di funzionalità respiratoria.

L'anamnesi è la raccolta di informazioni che possono indirizzare verso la diagnosi di asma, con particolare riguardo alla presenza di familiarità per malattie allergiche o polmonari alla storia personale di malattie atopiche ed alla presenza o meno di esposizione al fumo attivo e/o passivo. Il questionario attualmente più utilizzato è quello proposto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

I test allergometrici cercano di individuare un allergene che possa essere responsabile dei sintomi asmatici. I più noti includono i prick

test, il dosaggio delle IgE specifiche sieriche e la provocazione bronchiale specifica.

Le prove di funzionalità respiratoria sono molto importanti per la diagnosi di asma e per il suo controllo nel tempo e servono a valutare quanta aria riesce ad entrare ed uscire dal polmone in una determinata unità di tempo. La spirometria è la prova funzionale respiratoria più importante. I test di funzionalità respiratoria più utili per la diagnosi di asma includono il volume espiratorio massimo in un secondo, la capacità vitale forzata, il picco di flusso espiratorio, l'iperresponsività bronchiale. Il test per l'iperresponsività bronchiale è effettuato facendo inalare al paziente diverse concentrazioni o dosi di un agente broncocostrittore aspecifico (generalmente metacolina).

1.1.5. Classificazione

La definizione del fenotipo asmatico rappresenta un punto cruciale e controverso anche a causa dell'eterogeneità della malattia. In particolare, una sua accurata definizione è importante nel caso in cui si debba correlare con l'informazione genetica. In generale, l'asma viene classificata in due gruppi: asma estrinseco (allergico) e asma intrinseco (non-allergico). L'asma allergico è caratterizzato da sintomi che sono innescati da una reazione allergica. E' caratteristico dei pazienti con atopia, cioè con una particolare propensione a sviluppare reazioni di ipersensibilità associate in modo stretto alle cellule T-helper di tipo 2 (Th2) e alle IgE. L'insorgenza è tipicamente nell'infanzia in alcuni soggetti persiste o insorge in età adulta, altri vanno incontro a remissione nell'adolescenza.

L'asma intrinseco è caratteristico dei pazienti non atopici ed è responsabile di circa il 10% delle forme asmatiche dell'adulto. E' stata osservata un'associazione tra asma intrinseco e insorgenza della

malattia nell'età adulta. Molti dei sintomi dell'asma, allergico e non, sono gli stessi e legati all'ostruzione ed infiammazione delle vie aeree. Attualmente la classificazione clinica è basata su criteri che tengono conto della gravità e frequenza dei sintomi e sul grado di ostruzione bronchiale. Questa classificazione appare utile anche ai fini del trattamento farmacologico in quanto per ogni livello di gravità è prevista una terapia diversificata (Tabella 1).

Tabella 1. Classificazione dei livelli di gravità dell'asma.

Lieve Intermittente	Lieve Persistente	Moderato Persistente	Grave Persistente
Frequenza sintomi: < 2/settimana	Frequenza sintomi : > 2/settimana < 1 volta/giorno	Frequenza sintomi : tutti i giorni	Frequenza sintomi : sintomatologia continua
Sintomi notturni: < 2 per mese	Sintomi notturni: > 2/mese	Sintomi notturni: > 2/settimana	Sintomi notturni: frequenti
Funzione polmonare : > 80% del valore predetto	Funzione polmonare: > 80% del valore predetto	Funzione polmonare: > 60% < 80%	Funzione polmonare: ≤60%
Variabilità del Picco di flusso: < 20%	Variabilità del Picco di flusso: 20-30%	Variabilità del Picco di flusso: > 30%	Variabilità del Picco di flusso: > 30%

1.1.6. Reazione infiammatoria nell'asma : ruolo dei linfociti T.

Come precedentemente ricordato, è noto come alla base dei sintomi dell'asma vi sia uno stato di infiammazione cronica e di iperreattività delle vie aeree che induce una broncocostrizione e porti alla sintomatologia dell'asma.

La reazione infiammatoria nell'asma allergico si sviluppa in più tappe: una tappa d'inizio della risposta allergica sotto la dipendenza delle cellule dendritiche; una tappa effettrice con liberazione di molti mediatori da parte dei mastociti, eosinofili, linfociti T e monociti-macrofagi; una tappa di riparazione nello stadio di asma cronico, che riguarda le alterazioni in parte irreversibili dei bronchi.

Nella tappa di inizio un ruolo fondamentale è svolto dalle cellule dendritiche, presenti nelle vie aeree. Queste sono le principali cellule

che presentano gli antigeni, originano da precursori nel midollo osseo e formano una estesa rete di cellule interdigitate lungo tutto l'epitelio bronchiale. Dopo il processamento dell'antigene, attraverso la selezione di strutture peptidiche che servono per il legame con molecole di classe II dell'MHC, le cellule dendritiche migrano nei linfonodi dove l'allergene processato viene presentato alle cellule B e T (12).

Mentre il ruolo dei linfociti B nell'asma allergico è stato stabilito da tempo per la della sintesi di IgE specifiche contro gli allergeni, l'implicazione dei linfociti T nell'asma allergico è una conoscenza molto più recente. Studi iniziali avevano dimostrato, a partire da cloni linfocitari di origine murina, l'esistenza di due sottopopolazioni di linfociti T, Th1 e Th2 caratterizzati da uno profilo di produzione citochinica specifico: il sottotipo Th1 produce interferone- γ (IFN- γ), TNF- α , IL-2 ed è responsabile della risposta contro le infezioni virali e altri patogeni intracellulari, attiva i macrofagi; il sottotipo Th2, invece principalmente coinvolto nell'asma, secerne le citochine IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 ed IL-16. Il ruolo di alcune citochine nella reazione infiammatoria allergica è ben determinato. L'IL-4 induce la maturazione delle cellule B ed è in grado, se presente ad una concentrazione superiore a quella soglia, di indurre il differenziamento in direzione Th2 inibendo l'espansione Th1. La capacità di esprimere un diverso profilo citochinico implica l'espressione di funzioni diverse. Le cellule Th1 sono in grado di attivare i monociti/macrofagi coinvolgendoli nei cosiddetti "fenomeni di ipersensibilità ritardata". I linfociti Th1 inoltre inducono i linfociti B a produrre preferenzialmente anticorpi opsonizzanti e fissanti il complemento. Per contro, le cellule Th2 sono in grado di svolgere una maggiore attività di supporto alla sintesi di immunoglobuline (Ig), inducendo anche risposte di classe IgE ed IgG4; sono in grado di interagire con mastociti e granulociti eosinofili, di cui

guidano la maturazione, la differenziazione, l'attivazione, supportandone peraltro una prolungata sopravvivenza. Le cellule Th2 svolgono inoltre un'azione inibitoria sull'attivazione macrofagica indotta dalle cellule Th1 e mediante la IL-10 inibiscono la produzione di IL-12. I prototipi Th1 e Th2 si distinguono anche per la diversa attività citotossica e per le modalità di espressione dell'attività helper per la risposta umorale. Mentre le cellule Th2, generalmente prive di attività citotossica, esprimono una incondizionata attività helper per la sintesi di tutte le classi Ig, le cellule Th1, generalmente dotate di potenziale citotossico, svolgono un'attività helper per le maggiori classi Ig, ma non per le IgE a causa della loro produzione di IFN- γ (inibitorio sullo "switch" verso le IgE) e della mancata produzione di IL-4 (essenziale per lo "switch"). Inoltre la co-espressione da parte dei Th 1 di attività helper e citotossica fa sì che in certe condizioni la seconda prevalga sulla prima, con riduzione della risposta umorale. Le malattie allergiche sono causate da una risposta immunitaria aberrante di tipo Th2(13). I meccanismi che guidano la differenziazione funzionale verso Th1 o Th2 non sono ancora ben conosciuti. Certamente svolgono un ruolo essenziale le citochine presenti nel microambiente linfatico in cui avviene il primo incontro con l'antigene. Se una cellula T CD4 incontra l'antigene in presenza di IL-12 e/o IFN- γ , essa diverrà preferenzialmente una cellula effettrice T helper di tipo 1 (Th1), mentre sarà contestualmente inibita la sua differenziazione in cellula effettrice T helper di tipo 2 (Th2). Poiché generalmente IL-12 ed IFN- γ sono prodotti da macrofagi e cellule NK attivati nelle prime fasi della risposta a patogeni intracellulari, si comprende perché le risposte adottive verso tali patogeni siano dominate da meccanismi effettori messi in atto da cellule T CD4 di tipo Th1. Viceversa, uno stimolo antigenico che avvenga in assenza di IL-12 o di IFN- γ (o di IFN- α) consente alla cellula T naive di utilizzare la IL-4

prodotta in maniera autocrina dalle stesse cellule T naive per differenziare in un effettore Th2 produttore IL-4 ed IL-10. Queste due citochine peraltro svolgono un'azione inibitoria sulla differenziazione Th1, consentendo una polarizzazione della risposta adottiva in senso Th2. (14) Oltre al tipo di citochine presenti al momento del primo riconoscimento dell'antigene da parte del linfocita T naive, altri fattori sembrano influenzare il destino della differenziazione T. Un certo ruolo è svolto dal tipo di APC (cellula dendritica, , macrofago, linfocita B) che la cellula T naive incontra in relazione alle modalità della sua successiva differenziazione in cellula T effettrice. Anche la via di ingresso dell'antigene può influenzare lo sviluppo preferenziale di risposte Th1 (ad es. via parenterale) o Th2 (ad es. attraverso le mucose). Altri fattori che possono influenzare la differenziazione T in distinte popolazioni di cellule effettrici sono la natura e la quantità dell'antigene. Grandi quantità di peptidi che possono venire presentati con alta densità tendono ad indurre risposte Th1, mentre la presentazione di peptidi a bassa densità tende a favorire risposte Th2. Peptidi antigenici che interagiscono molto bene con il TCR del linfocita T naive tendono a favorire risposte Th1, mentre peptidi che legano debolmente il TCR più facilmente inducono risposte Th2. Le cellule Th2 sono molto importanti nella realizzazione di un'efficace e rapida risposta umorale nei confronti di patogeni extracellulari con alto ritmo replicativo, marcata invasività ed eventuale capacità di liberare esotossine. Una volta fagocitati, tali patogeni non possono più replicare all'interno dell'APC ed i loro antigeni vengono presentati con relativa bassa densità. Al contrario le cellule Th1 sono più adatte a fronteggiare infezioni da patogeni intracellulari, in cui è essenziale l'eliminazione della cellula infettata o l'attivazione massimale delle capacità battericide del macrofago che ospita il patogeno. Al momento attuale è ancora controverso il ruolo

delle cellule Th1 nelle reazioni allergiche e nell'asma. Una serie di recenti evidenze sperimentali sostengono comunque un ruolo di questo sottotipo di linfociti T nelle esacerbazioni della malattia, soprattutto in seguito all'esposizione a patogeni ed infezioni.

1.1.7. Eziologia dell'asma

L'asma è una malattia multifattoriale causata dall'interazione di geni predisponenti in associazione con fattori ambientali. L'ereditarietà dei caratteri multifattoriali si può spiegare con il modello soglia, che assume che esista una predisposizione verso lo sviluppo di una patologia, e che questa predisposizione sia distribuita normalmente nella popolazione generale. La predisposizione è costituita dalla combinazione di quei fattori sia genetici che ambientali che possono portare all'espressione del carattere. Gli individui mostreranno una maggiore o minore predisposizione nei confronti del carattere a seconda di quanti geni predisponenti hanno ereditato e del grado della loro esposizione a rilevanti fattori ambientali. Fino a un certo punto essi non mostreranno alcun segno del carattere, tuttavia quando un valore soglia di predisposizione viene superato il carattere compare. Alcuni soggetti, pur essendo esposti a limitato rischio ambientale supereranno il valore soglia perché presentano molti fattori di rischio genetici. Per altri, il maggior contributo alla predisposizione può essere di tipo ambientale ma una volta raggiunta la soglia il risultato sarà identico.

Un metodo per stimare la componente ereditaria e quella ambientale di un tratto è lo studio dei gemelli (15). Il confronto della concordanza di un carattere in gemelli identici con quella in gemelli fraterni o in semplici fratelli, costituisce un efficace sistema per definire in che misura un carattere sia geneticamente determinato. Parametri come il λ_R (rischio relativo) o l'h (ereditarietà), ci forniscono delle importantissime

informazioni relative al ruolo della componente genetica nell'insorgenza del fenotipo di interesse.

Il λR o rischio relativo, misura il rischio di un parente di un probando rispetto al rischio della popolazione in generale. In genere si misura l'incidenza nei fratelli dei probandi rispetto all'incidenza nella popolazione generale (λs , $\lambda sibs$). Il contributo della componente genetica nella patologia sarà tanto più alto quanto più i valori di λR si discordano dall'unità e, in genere, saranno più significativi nei familiari stretti (fratelli, parenti di primo grado in genere) rispetto ai parenti lontani che, ovviamente, condividono una percentuale inferiore del loro genoma.

L' h misura l'ereditabilità (h) di un carattere. Il valore di h può essere stimato con diversi approcci ma sicuramente il metodo più elegante è rappresentato dallo studio dei gemelli.

Gli studi sui gemelli hanno contribuito in modo significativo alla comprensione della genetica dell'asma e dell'esistenza di fattori genetici comuni coinvolti nell'asma, nell'atopia e nella responsività bronchiale (24). Studi sui gemelli condotti su larga scala in diverse parti del mondo hanno portato a risultati comparabili, stimando un'ereditabilità che varia tra il 36%, in uno studio finlandese, ed il 77% circa in studi su gemelli australiani, danesi e inglesi (25).

1.1.8. Fattori di rischio per l'insorgenza di asma

1.1.8.1. Fattori ambientali

Nonostante il ruolo dei diversi fattori ambientali non sia ben definito, esistono indicazioni precise relative ad alcuni di essi. Gli allergeni, soprattutto inalanti, rappresentano i fattori ambientali più frequentemente causa di asma e tra questi in particolare i pollini, gli acari ed i derivati epidermici degli animali, mentre più raramente le spore fungine, gli alimenti e i farmaci.

I pollini sono dei potenti allergeni perché hanno una dimensione che permette loro di penetrare facilmente nell'albero bronchiale e di localizzarsi nei piccoli bronchi. Tra i pollini ricordiamo in ordine di frequenza: Graminacee, Parietaria ed Oleacee. Un allergene molto comune è un derivato gastrointestinale degli acari *Dermatofagoides pteronyssinus* e *D. farinae*, che si trovano nelle polveri di casa, nei letti, tappezzeria, moquette e peluche. Le forfore ed i derivati animali comprendono in ordine di frequenza quelle del gatto (il cui allergene è prodotto dalle ghiandole sebacee e si accumula soprattutto sui peli), del cane, del cavallo, del coniglio, ecc. Tra le spore fungine le principali responsabili di reazioni allergiche sono le spore di *Alternaria*. Tra gli alimenti provoca reazioni asmatiche il latte vaccino, assunto in età pediatrica, ma, anche se di rado, tutti gli allergeni che interessano il tratto gastro-intestinale possono dare potenzialmente reazioni asmatiche.

La precocità di esposizione ad un allergene è un fattore che predispone il sistema immunitario verso la reazione allergica. Il contatto precoce con fattori derivati dalla madre, trasmissibili attraverso la placenta (sensibilizzazione intrauterina del feto) o l'allattamento, e con alcune sostanze che si trovano nel latte artificiale o negli omogeneizzati, in un momento in cui la barriera intestinale non è ancora matura e permette il

passaggio di sostanze dannose, sono fattori di rischio per l'insorgenza di allergie.

Altri fattori particolarmente importanti per lo sviluppo di allergie a carico del sistema immunitario respiratorio sono quelli presenti negli ambienti esterni e interni, come per esempio le abitazioni. Nell'ambiente esterno, per esempio, l'inquinamento industriale dovuto alla presenza di anidride carbonica, ozono, anidride solforosa, metalli pesanti agisce sia alterando la barriera cutanea e mucosa, danneggiandola per favorire il passaggio di allergeni, sia legando ad esempio determinati pollini. I fattori di rischio dell'ambiente interno sono invece la scarsa ventilazione, il fumo di tabacco, gli acari della polvere, la presenza di animali domestici e gli stessi materiali con cui vengono costruite le abitazioni. Anche il numero dei figli e fattori associati allo stato socio-economico sono elementi importanti dell'ambiente interno.

Esistono poi allergeni, quali gli isocianati presenti nelle sostanze plastiche e nelle vernici, ed il lattice, presente negli ambienti sanitari o nell'ambiente esterno in seguito all'usura dei pneumatici, che sono coinvolti nell'asma professionale di tipo allergico.

Fra le cause dell'asma e delle allergie sono inoltre implicati molti fattori di rischio perinatale che comprendono l'età, l'alimentazione e l'abitudine al fumo della madre, la durata della gestazione, la prematurità ed il basso peso alla nascita, anche se non è stato dimostrato il contributo sostanziale di questi fattori nell'insorgenza dell'asma (16).

1.1.8.2. Fattori individuali

L'atopia è uno dei più importanti fattori di rischio predisponente allo sviluppo dell'asma e può anche avere un effetto negativo sulla funzione polmonare, indipendentemente dall'asma, a partire già dall'età di tre anni (17). Un individuo infatti atopico ha una più alta probabilità di sviluppare l'asma e individui con una storia familiare di atopia hanno un rischio più alto.

Altri fattori eziologici predisponenti importanti sono: l'iperreattività bronchiale (18); il sesso, dimostrato da un certo numero di geni che sono associati all'asma maggiormente nei maschi che nelle femmine (*Interleukin1- β* nei maschi (19), *ADRB2*, iperresponsività bronchiale nelle femmine, *Vitamin D Receptor*, alti livelli di IgE nelle femmine (20) e *COX2*, asma nelle femmine (21); i fattori socio-economici ed ambientali, principali responsabili delle apparenti differenze basate su razza ed etnia nella prevalenza dell'asma.

1.1.8.3. Teoria dell'igiene

La diffusione della patologia allergica in età pediatrica, in particolare nei paesi industrializzati, potrebbe trovare una spiegazione nella così detta "teoria dell'igiene", elaborata per la prima volta da Strachan nel 1989. Secondo tale ipotesi, i bambini che vivono nei paesi sviluppati sarebbero predisposti allo sviluppo di allergia a causa della ridotta stimolazione antigenica ambientale cui sono sottoposti nella prima infanzia, a seguito delle migliori condizioni igienico-sanitarie. In questi soggetti risulterebbe compromesso il fisiologico "switch" del sistema immunitario da un tipo di risposta Th2, agli stimoli antigenici, verso una risposta di tipo Th1, con conseguente persistenza del profilo citochinico di tipo Th2, correlato all'insorgenza di allergia (22).

2. Genetica dell'asma allergico: stato dell'arte

L'asma e i fenotipi correlati hanno una natura ereditaria importante, che non segue una modalità di trasmissione classica mendeliana (23). Numerosi studi sono stati condotti per comprendere la componente ereditaria dell'asma. I risultati di questi studi variano enormemente e associazioni riscontrate in alcune popolazioni non sono state replicate in altre. Il primo studio di linkage sull'intero genoma, alla ricerca di geni di suscettibilità all'asma, risale al 1996. Da allora ad oggi sono state condotte numerose analisi di questo tipo che, nel complesso, hanno identificato più di 20 regioni cromosomiche distinte associate all'asma e/o a tratti correlati. Una recente review su "Asthma genetics" ha identificato 25 geni associati con asma o atopia in 6 o più popolazioni e 54 geni in 2-5 popolazioni. Gli autori concludono che il numero totale dei geni che conferiscono suscettibilità all'asma è più di cento (25).

Qui di seguito sono riportate alcune tra le regioni che hanno ricevuto maggiore attenzione perché contengono un largo numero di geni candidati per funzione e/o per posizione, associati ad asma ed i suoi subfenotipi.

Sul cromosoma 2q32-q33 il gene *CTLA-4*, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, è un interessante gene candidato per funzione perché coinvolto nell'attivazione delle cellule T e nella regolazione delle IgE (25). Sempre nel cromosoma 2q si trova il cluster dell' *IL-1*, che fa parte della famiglia delle citochine ed è implicata nelle risposte infiammatorie (25). Il gene *DPP10* nel 2q14 codifica per una proteina che appartiene alla famiglia delle dipeptidil-peptidasi, enzimi che catalizzano il clivaggio dei dipeptidi terminali delle proteine. Gli autori speculano il suo coinvolgimento nel clivaggio delle chemochine e delle citochine (per l'omologia con *DPP4*) o nella regolazione neuronale del tono della muscolatura liscia delle vie aeree (in modo analogo a *DPP6*).

Mancano ancora studi funzionali che avvalorino queste ipotesi e chiariscano la funzione di questo gene nell'asma (26).

Nella regione 5q23-21 è presente il cluster di geni che codificano per le interleuchine IL-4, IL-13, IL-9, IL-5. Queste citochine, secrete dai leucociti, regolano la risposta immunitaria cellulare e umorale. L'IL-4, in particolare è una citochina cruciale nella risposta allergica, promuovendo il passaggio isotipico nelle cellule B verso la sintesi di IgE, dirigendo i linfociti T verso una via di differenziazione di tipo Th2 (25). La regione 5q31 contiene il cluster di differenziazione (*CD14*) e il "granulocyte macrophage colony stimulating factor" (GM-CSF), che sono importanti per lo sviluppo e per la progressione dell'infiammazione associata con l'allergia e l'asma.

Il cromosoma 6 contiene diversi geni coinvolti nella risposta immunitaria innata e specifica (27,32). Tra questi il cluster dell'HLA comprende un gruppo di geni polimorfici che codificano per proteine espresse sulla membrana cellulare, le quali espletano una funzione di riconoscimento di epitopi antigenici da parte dei linfociti T. Sempre nel cromosoma 6, *HLA-G* nella regione 6p2 è stato riportato in linkage con l'asma almeno in 7 popolazioni (28,32).

Nel 7p15-p14 si trova il gene *GPRA*, la cui proteina appartiene ad una famiglia di recettori accoppiati alle proteine G; ne esistono due isoforme derivate da splicing alternativi, espresse differientemente nel tessuto polmonare di individui sani ed asmatici. Gli autori ipotizzano che *GPRA* possa agire come recettore di un ligando non identificato. Tale ligando, le isoforme del suo recettore e le molecole di traduzione del segnale potrebbero definire una nuova via critica per la patogenesi dell'asma (29,33).

La catena beta di *FcεRI* è localizzata sul cromosoma 11q13 (30). La variazione della catena β può colpire la stabilità del recettore

modificandone la funzione. Il gene *CC10* sempre nel cromosoma 11 codifica per una proteina di 10 kDa espressa nelle cellule Clara. E' un modulatore dell'immunità ed ha un ruolo diretto nella regolazione della risposta infiammatoria mediata dalle cellule T (25).

Nel cromosoma 12, si trovano diversi geni candidati nella patogenesi dell'asma. Il gene *STAT6* nel 12q13 codifica per una molecola critica nella via di trasduzione del segnale IL-4/IL-13 e nello sviluppo delle cellule Th2 (31). Anche il gene dell'interferone- γ (*IFN- γ*) si trova sul cromosoma 12 e codifica per l'omonima proteina. L'*IFN- γ* è una citochina prodotta dai linfociti T e la sua principale funzione è quella di difendere il nostro organismo da virus e patogeni intracellulari inducendo la risposta immunitaria e potenziando l'azione dei macrofagi (31). Nella regione sono localizzati inoltre le citochine IL22 e IL26, già implicate nella patogenesi dell'asma.

La regione cromosomica 13q14 è stata trovata in linkage con i valori di siero totale di IgA, e con i livelli di IgE(35). *PHF11* nel 13q14 codifica per una proteina che contiene due motivi zinc-finger, tipici dei fattori di trascrizione. Tra le varianti di splicing una è espressa solo nel polmone e nei leucociti del sangue periferico, in particolare nei linfociti T e B inattivi dove forse agisce come repressore della trascrizione di alcuni geni. Si pensa che sia coinvolto nella regolazione della sintesi delle IgE (36).

Nel cromosoma 16p il recettore dell'IL-4, prodotta dalle cellule T, regola la proliferazione e differenziazione di una varietà di cellule in seguito al legame del recettore alla superficie cellulare (30).

ADAM33 nel 20p13 appartiene alla famiglia di geni che codificano per metalloproteasi ancorate alla membrana, zinco-dipendenti, implicate nelle interazioni, nella fusione e nelle vie di segnale delle cellule. E'

stato ipotizzato il suo coinvolgimento nel rimodellamento del tessuto delle vie aeree (37).

Gli approcci classici utilizzati per l'identificazione di geni di suscettibilità implicati in malattie complesse comprendono essenzialmente studi di linkage, e studi di associazione che utilizzano marcatori del DNA polimorfici (microsatelliti) o biallelici (Single Nucleotide Polymorphism, SNP).

2.1. Analisi di linkage

L'analisi di linkage rappresenta una metodologia statistica classica dell'analisi genetica, che mira a stabilire una correlazione tra la trasmissione del gene-malattia in famiglie di pazienti affetti e la trasmissione di marcatori polimorfici di cui sia nota la localizzazione sul genoma. La sua applicazione prevede sia l'indagine di marcatori disposti sull'intero genoma (genome-wide scan) che su particolari regioni candidate.

I metodi di linkage non parametrici sono considerati la migliore strategia per localizzare geni coinvolti nella suscettibilità alle malattie complesse, essendo indipendenti dalla specificazione del modello di trasmissione. Un comune approccio consiste nella stima della condivisione allelica tra coppie di parenti affetti allo scopo di determinare se soggetti malati per una certa patologia e imparentati ereditano copie di alleli "identici per discendenza" (IBD) più spesso di quanto ci si aspetterebbe per puro effetto del caso. Le coppie di fratelli affetti costituiscono la struttura familiare più semplice alla quale si applicano i metodi di condivisione allelica. L'analisi su coppie di fratelli affetti (ASPs), si basa sul presupposto che se due fratelli sono entrambi ammalati della stessa patologia avranno molto probabilmente ereditato dai loro genitori copie identiche della stessa regione sub-cromosomica (contenente il gene di

suscettibilità alla malattia). Due fratelli condividono in media per ciascun locus zero, uno o due alleli IBD con probabilità del 25, 50 e 25% rispettivamente. In un campione di coppie di fratelli affetti, in assenza di linkage tra un marcatore e il gene malattia, ci si attenderà dunque una simile distribuzione, mentre in caso di linkage si osserverà un aumento delle coppie di fratelli che condividono uno o due alleli IBD (ed una diminuzione delle coppie che condividono zero alleli IBD).

2.2 Studi di associazione.

L'associazione è l'altra metodologia classica utilizzata negli studi di genetica delle malattie complesse. Esistono fondamentalmente due tipi di analisi di associazione: il metodo del caso-controllo e quello del TDT. Con il metodo del caso-controllo si valuta l'associazione tra un determinato gene e il fenotipo in esame attraverso il confronto tra la frequenza di uno specifico allele nel gruppo di studio (pazienti asmatici, per esempio) rispetto al gruppo di controllo (soggetti sani). Questo metodo pur essendo estremamente utile richiede una cura estrema nella scelta del gruppo di controllo. Dato che in questo gruppo si calcolano le frequenze alleliche di riferimento, se non si dispone di quello adatto è molto facile ottenere dei risultati spuri e delle false associazioni.

Il TDT è uno studio di associazione su base familiare ed è stato adottato per ovviare al problema dei controlli. Nel TDT il campione di controllo è infatti costituito dall'insieme degli alleli non trasmessi dai genitori ai soggetti affetti, mentre il campione di casi è costituito dagli alleli presenti nei casi e quindi trasmessi. Per avere dei dati significativi e' tuttavia necessario disporre di un grosso numero di famiglie informative e questo rappresenta il grosso ostacolo all'utilizzo della metodica.

Attualmente le analisi di associazione vengono condotte preferenzialmente attraverso l'uso degli SNPs. Questi marcatori, scoperti

negli anni 80, sono variazioni di sequenza del DNA che si verificano quando è alterato un singolo nucleotide della sequenza genomica. Affinché una variazione nella sequenza nucleotidica sia considerata uno SNP, deve essere presente in almeno l'1% della popolazione. A differenza dei microsatelliti, gli SNPs non sono sequenze ripetute e possono trovarsi sia nelle regioni codificanti che non-codificanti del genoma. Al momento sono i marcatori molecolari più utilizzati sia per loro elevata densità lungo tutto il genoma che perché sono state sviluppate delle nuove piattaforme tecnologiche che consentono di genotipizzarne un numero elevato per singolo individuo in un unico saggio. Essi costituiscono circa il 90% di tutti i polimorfismi presenti nel genoma umano, con una frequenza stimata nell'uomo pari a 1/700bp e sono responsabili di una parte rilevante della variabilità tra individui.

L'analisi di associazione con gli SNPs consente oggi di delimitare le regioni cromosomiche contenenti geni di suscettibilità per una certa patologia, di confermare o smentire risultati di linkage o l'implicazione, in quel certo campione in studio, di un certo gene candidato. Tuttavia, prima di poter affermare con sicurezza che un certo locus contiene un gene di suscettibilità, in particolare per una malattia complessa, è necessario da un lato replicare il risultato e dall'altro studiare gli effetti della/e variante/i associata/e, soprattutto nel caso in cui non ci siano sufficienti elementi funzionali a favore.

3. Obiettivo dello studio

La moltitudine di studi condotti dalla comunità scientifica e la difficoltà a riprodurre i risultati in popolazioni distinte conferma l'estrema difficoltà nel comprendere le basi genetiche di una malattia multifattoriale come l'asma.

L'obiettivo di questo studio è quello di identificare i geni di suscettibilità all'asma allergico nella popolazione sarda. In questa popolazione, infatti, la maggiore omogeneità genetica insieme all'uniformità dei fattori ambientali, che limita la possibilità di mancata espressività dei geni, aumentano la probabilità di identificare i geni associati alla malattia.

Una migliore conoscenza degli eventi che attivano, regolano e perpetuano l'infiammazione bronchiale in risposta a stimoli di tipo allergico e non, può portare alla diagnosi precoce e alla prevenzione, nonché allo sviluppo di nuovi obiettivi di trattamento farmacologico per questa patologia.

4. Risultati

4.1 Analisi di linkage del cromosoma 12q13-24.

Nella prima fase di questo studio abbiamo condotto un'analisi di linkage non parametrico (ASP, affected sib pairs), utilizzando marcatori microsatelliti disposti ad una densità di circa 10 cM lungo tutto il genoma, al fine di individuare eventuali regioni sub-cromosomiche candidate a contenere geni di suscettibilità. Abbiamo trovato evidenze di linkage significative in diverse regioni, e tra queste ci siamo focalizzati sulla regione 12q13-24 perché trovata in linkage con l'asma e fenotipi atopici da diversi gruppi in varie popolazioni (28,38,). In particolare le due regioni vicine al gene *IFN- γ* e al gene *NOS1* (nitric oxide synthase 1) sono state precedentemente oggetto di studi di linkage e di associazione per le patologie correlate all'asma atopica (28, 40).

Sul cromosoma 12 abbiamo condotto uno studio di linkage genotipizzando 17 marcatori su 100 famiglie provenienti dalle quattro province sarde, contenenti 121 coppie di pazienti affetti da asma allergico (sib pairs) (Tabella 2).

I marcatori microsatelliti sono stati selezionati da un pannello di 400 marcatori della "Marshfield Center for Medical Genetics". La trasmissione mendeliana degli alleli all'interno di ciascuna famiglia è stata verificata utilizzando il programma Genetic Profiler. I genotipi delle famiglie per l'analisi di linkage non parametrica multipoint sono stati analizzati con il programma GENEHUNTER, che si basa sulla distribuzione di probabilità che le coppie di fratelli affetti condividano 0, 1 o 2 alleli identici per discendenza (IBD). I LOD score sono stati calcolati senza assumere parametri di ereditarietà.

Tabella 2. Caratteristiche del campione di famiglie Sarde studiate tramite linkage e TDT.

	Linkage			TDT	
	Campione intero	Età d'esordio ≤13	Età d'esordio >13	Campione intero	Persistenti esordio precoce
Individui	410	243	167	1100	453
Famiglie (sibs)	100 (121)	60 (66)	40 (55)	294	139
Maschi %	61%	69%	43%	56%	63%
Età d'esordio	10.69 ± 10.76	5.13 ± 3.61	18.41 ± 12.51	10.15 ± 10.82	4.79 ± 3.59
Età	21.86 ± 12.37	15.51 ± 6.47	30.76 ± 13.18	20.39 ± 12.10	15.95 ± 8.22

La tabella mostra le caratteristiche del campione studiato mediante analisi di linkage e TDT. I sib-pairs nel gruppo dei pazienti ad insorgenza precoce ≤13 sono concordanti per età di esordio dell'asma. Il gruppo con età di insorgenza >13 anni comprende i sibs entrambi concordanti e discordanti per l'insorgenza. Solo un sib affetto è incluso nell'analisi del TDT. Le famiglie sono state selezionate dalle quattro province sarde in proporzione rappresentativa della popolazione locale.

L'analisi di linkage non parametrico ha mostrato un valore di LOD score di 1.93 ($p=2.58 \times 10^{-3}$), che rappresenta solo un valore suggestivo di linkage, con un picco corrispondente al marcatore D12S75 (Figura 1A).

Per aumentare il potere statistico abbiamo ripetuto l'analisi di linkage stratificando il campione per fenotipo clinico, considerando come parametro l'età di esordio e partendo dal presupposto che sub-gruppi di pazienti con diverse caratteristiche cliniche potrebbero avere differenti componenti genetiche responsabili della malattia (Tabella 2). E' stato scelto come cut-off 13 anni, sulla base di osservazioni cliniche circa la variabilità fenotipica dei pazienti con insorgenza di asma prima e dopo la pubertà. I risultati dell'analisi hanno rivelato che la regione 12q13-24 è significativamente in linkage con l'asma allergico in un sottogruppo di 60 famiglie (66 sibs) con casi esclusivamente ad insorgenza precoce (≤13 anni), con un LOD score massimo di 3.56 ($P=5.2 \times 10^{-5}$) fra il marcatore D12S75 e D12S335 (Figura 1A). Invece non c'è evidenza di linkage nelle famiglie con almeno un paziente con età di esordio superiore ai 13 anni (massimo LOD score = 0.4) (Figura 1A).

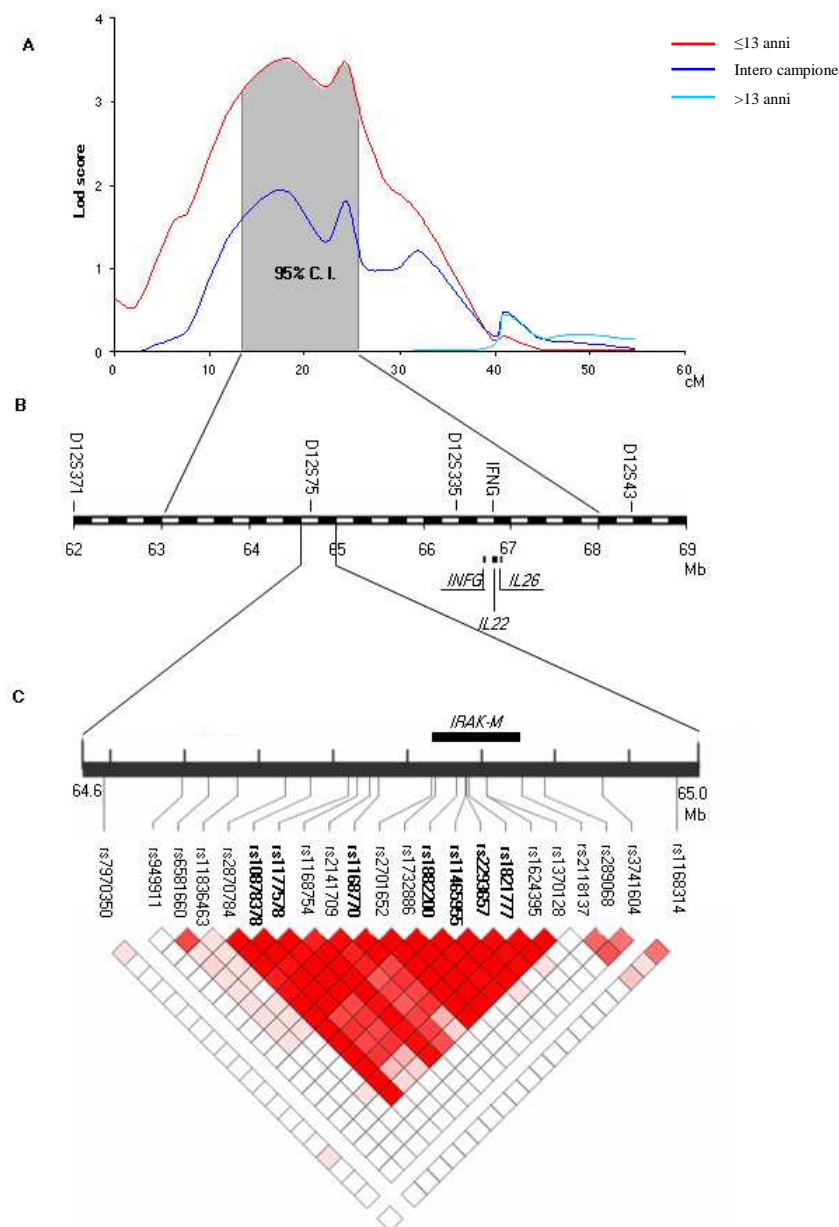


Figura 1. Nella figura 1 è illustrata la successione di approcci che hanno portato all'identificazione del gene *IRAK-M* nella regione 12q13-24 a partire dall'analisi di linkage su tutto il campione, all'analisi sul campione stratificato in base ad età di esordio, allo studio di associazione tramite il TDT con l'uso di SNPs che ricoprono la regione che comprende *IRAK-M* e all'identificazione del blocco di linkage disequilibrium. A) Analisi di linkage sul campione stratificato B) Intervallo di confidenza 95% stimato per la localizzazione del gene *IRAK-M*; geni che si trovano nell'intervallo (*INGγ*, *IL22*, *IL26*). C) Blocco di LD esteso 400 Kb (in rosso) contenente *IRAK-M* (sbarra nera); gli SNPs sono quelli utilizzati per il TDT; sette SNPs (in grassetto) sono significativi dopo la correzione con test multipli.

4.2. Analisi di associazione

L'analisi di linkage multipoint sulle coppie di fratelli concordanti per l'asma ad esordio precoce ha identificato una regione piuttosto ampia, di 10.5 cM, con elevata probabilità di contenere geni/e di suscettibilità all'asma allergico (intervallo di confidenza al 95%).

In questa regione sono localizzati numerosi geni candidati per funzione, potenzialmente coinvolti nella predisposizione all'asma. Tra questi ci siamo inizialmente focalizzati sull'*Interferone- γ* (*IFN- γ*), l'*Interleuchina-22* (*IL-22*) e l'*Interleuchina-26* (*IL-26*), che codificano per citochine già implicate nell'asma(39). L'*IFN- γ* , per esempio, gioca un ruolo importante nella differenziazione delle cellule Th2. Nakao e collaboratori hanno dimostrato associazione tra un polimorfismo del gene *IFN- γ* (un repeat CA) e l'asma atopico nei bambini (28). L'analisi di sequenza delle regioni codificanti di questi geni nei pazienti asmatici che contribuivano al linkage in questa regione non ha messo in evidenza alcuna mutazione. In seguito abbiamo considerato un altro gene candidato, *IRAK-M*, che per funzione poteva essere implicato nell'asma. Infatti questo gene codifica per una proteina che fa parte della via dei recettori di tipo Toll (Toll-Like-Receptors, TLR) e del recettore dell'IL-1 (IL-1R). La funzione di *IRAK-M* è quella di regolatore negativo della via del segnale dei TLR/IL-1R (41), che giocano un ruolo chiave nella difesa e nella regolazione delle risposte immunitarie innate.

Per verificare il coinvolgimento di *IRAK-M* nella predisposizione all'asma allergico, abbiamo condotto studi di associazione sia tramite il TDT, che con il caso-controllo su una regione di 387 Kb, che comprende *IRAK-M*. In questa regione abbiamo selezionato 22 SNPs che sono stati genotipizzati su un campione esteso costituito da 294 famiglie con asma, di cui 100 sono le stesse utilizzate per l'analisi di linkage iniziale e 194 famiglie aggiuntive (Tabelle 2 e 3).

Il TDT è stato condotto sia sul campione intero che su quello stratificato sulla base dell'età di insorgenza e considerando di ogni famiglia soltanto i propositi ed i loro genitori (trios). E' stata trovata forte evidenza di associazione esclusivamente nel sottogruppo che include soggetti con asma persistente ad insorgenza precoce. Tra i 22 SNPs analizzati sette SNP hanno mostrato p-values significativi, di cui quattro mappanti nel gene *IRAK-M* (rs1882200, rs11465955, rs2293657, e rs1821777) ed i rimanenti tre (rs10878378, rs1177578, e rs1168770) si trovano diverse kilobasi a monte del gene (Figura 1C).

L'analisi del linkage disequilibrium (LD) in questa regione ha definito un singolo blocco di LD di 138-kb con valori di $D' \geq 0.70$, contenente tutto il gene. In questo blocco di LD abbiamo identificato 6 SNPs, i cosiddetti SNPs "tag", che racchiudono tutta la variabilità dell'informazione genetica della regione. L'analisi degli aplotipi identificati dai questi SNPs ha mostrato che gli aplotipi più frequenti, GGGTAT e GCACGC, sono rispettivamente trasmessi e non trasmessi nei pazienti asmatici con asma persistente ad esordio precoce (rispettivamente $P=.0011$ e $P=.0282$) (Tabella 3).

Per confermare con un'analisi indipendente l'associazione di *IRAK-M* con asma allergico nel nostro campione di individui affetti, abbiamo effettuato uno studio caso-controllo utilizzando un sottogruppo di 139 pazienti con asma persistente ad esordio precoce come casi e 460 soggetti sani come controlli (Tabella 4 e 5). Questa analisi ha confermato l'associazione per i quattro SNPs intragenici per questo fenotipo, con valori significativi anche dopo la correzione di Bonferroni per test multipli. L'analisi ha inoltre rivelato che tre SNPs tag all'interno di *IRAK-M*, rs11465955, rs1624395, rs1370128, sono sufficienti per identificare l'aplotipo di rischio e quello di predisposizione. L'aplotipo di rischio (TAT) è associato con asma persistente ad esordio precoce

(46% casi, 35.6% controlli), a differenza dell'aplotipo protettivo (CGC) che risulta meno frequente nei casi che nei controlli (46.4% contro 56.8%) (Tabella 6).

Tabella 3. Risultati dell'analisi di associazione attraverso il TDT nei trios con asma ad insorgenza precoce e persistente

SNP ^a	Frequenza	T :U ^b	P ^c	P empirico (10 ⁵ permutazioni)
rs7970350	0.398	30 :42	0.1572	0.8416
rs949911	0.142	25 :27	0.7815	1.0000
rs6581660	0.273	48 :34	0.1220	0.7359
rs11836463	0.241	42 :34	0.3587	0.9904
rs2870784	0.171	30 :24	0.4142	0.9984
rs10878378	0.413	25 :59	0.0002	0.0018
rs1177578	0.413	27 :66	0.0000	0.0003
rs1168754	0.167	27 :23	0.5716	1.0000
rs2141709	0.317	23 :45	0.0076	0.0726
rs1168770	0.414	27 :62	0.0002	0.0017
rs2701652	0.180	25 :23	0.7728	1.0000
rs1732886	0.181	26 :26	1.0000	1.0000
rs1882200	0.396	60 :30	0.0007	0.0094
rs11465955	0.391	58 :28	0.0012	0.0113
rs2293657	0.392	58 :27	0.0007	0.0063
rs1821777	0.398	55 :29	0.0045	0.0294
rs1624395	0.451	47 :29	0.0389	0.3453
rs1370128	0.471	49 :32	0.0489	0.4524
rs2118137	0.324	46 :50	0.6830	1.0000
rs289068	0.232	34 :34	1.0000	1.0000
rs3741604	0.338	38 :46	0.3827	0.9945
rs1168314	0.350	38 :52	0.1400	0.7785
Aplotipi				
G G G T A T	0.385	61 :28	0.0005	0.0011
G C A C G C	0.277	23 :46	0.0057	0.0282
T G G C G C	0.165	31 :22	0.2163	0.8403
G C G C A T	0.057	7 :16	0.0587	0.3274

a) Frequenza dell'allele minore degli SNPs e degli aplotipi. b. T:U denota il numero degli alleli trasmessi rispetto a quelli non trasmessi. c. p-values significativi in grassetto. I quattro aplotipi identificati attraverso 6 SNPs tag (rs2870784, rs1177578, rs2141709, rs11465955, rs1624395, rs1370128) sono evidenziati in grassetto.

Tabella 4. Caratteristiche del campione sardo e di quello italiano usati nello Studio Caso-Controllo.

	Campione Sardo	Campione Italiano		
	Soggetti con asma ad esordio precoce persistente	Controlli Sani	Casi ^a	Controlli
Numero di soggetti	139	460	67	278
Età	22.37 ± 8.61	30.12 ± 10.09	38.32 ± 9.69	39.01 ± 6.32
Maschi %	55.40	41.30	46.96	48.56

a) L'età di insorgenza della malattia dei pazienti atopici italiani non è nota, per cui sono stati considerati gli individui atopici con persistenza dell'asma a 18 anni.

Tabella 5. Analisi Caso-controllo utilizzando 22 SNPs nella regione genomica che comprende il gene *IRAK-M*.

SNP		Frequenza dell'allele 2		Allele 2 rispetto all'allele 1		Genotipo				
Marker	Allele1/2	Casi	Controlli	P ^a	OR (95% CI) ^b	Casi	Controlli	P ^a	OR Hom (95% CI)	OR Het (95% CI)
rs7970350	T/C	0.336	0.381	0.2315	0.834 (0.620 – 1.122)	62/54/18	182/197/74	0.4748	0.714 (0.379 – 1.343)	0.804 (0.513 – 1.260)
rs949911	C/A	0.137	0.148	0.1921	0.755 (0.495 – 1.151)	103/34/2	335/112/12	0.4040	0.420 (0.083 – 2.135)	0.796 (0.493 – 1.286)
rs6581660	T/G	0.291	0.280	0.4831	1.124 (0.811 – 1.559)	66/58/10	239/179/38	0.7821	1.260 (0.566 – 2.807)	1.126 (0.731 – 1.734)
rs11836463	C/A	0.241	0.281	0.1689	0.788 (0.561 – 1.106)	78/52/7	242/176/41	0.3887	0.616 (0.253 – 1.499)	0.791 (0.512 – 1.224)
rs2870784	G/T	0.187	0.195	0.3707	0.837 (0.567 – 1.235)	85/48/1	296/144/17	0.1790	1.100 (0.708 – 1.708)	0.155 (0.020 – 1.225)
rs10878378	T/A	0.342	0.413	0.0297	1.399 (1.033 – 1.894)	59/61/16	160/211/81	0.0942	1.960 (1.020 – 3.764)	1.402 (0.735 – 2.672)
rs1177578	G/C	0.338	0.416	0.0145	1.458 (1.077 – 1.972)	61/62/16	159/210/83	0.0500	2.113 (1.103 – 4.050)	1.439 (0.756 – 2.739)
rs1168754	G/C	0.180	0.193	0.3361	0.826 (0.560 – 1.219)	88/47/1	295/138/18	0.7040	1.089 (0.702 – 1.687)	0.167 (0.022 – 1.305)
rs2141709	G/A	0.263	0.322	0.0514	0.724 (0.523 – 1.002)	75/55/9	213/191/51	0.1497	0.493 (0.220 – 1.106)	0.752 (0.489 – 1.155)
rs1168770	A/G	0.335	0.415	0.0089	1.506 (1.108 – 2.046)	60/61/15	162/212/84	0.0330	2.298 (1.180 – 4.471)	1.553 (0.804 – 2.300)
rs2701652	G/C	0.167	0.209	0.1847	0.751 (0.492 – 1.146)	91/43/1	289/148/22	0.1937	0.146 (0.018 – 1.177)	0.934 (0.573 – 1.524)
rs1732886	A/G	0.159	0.210	0.1063	0.704 (0.460 – 1.077)	95/42/1	288/148/22	0.1614	0.139 (0.017 – 1.118)	0.863 (0.528 – 1.409)
rs1882200	C/T	0.460	0.341	0.0012	1.721 (1.240 – 2.390)	39/72/28	207/190/61	0.0022	2.676 (1.360 – 5.268)	2.189 (1.312 – 3.650)
rs11465955	C/T	0.460	0.354	0.0005	1.680 (1.256 – 2.248)	39/71/28	198/197/64	0.0010	2.599 (1.413 – 4.780)	2.240 (1.393 – 3.603)
rs2293657	A/T	0.460	0.341	0.0013	1.708 (1.232 – 2.368)	39/71/28	209/186/63	0.0022	2.636 (1.343 – 5.173)	2.179 (1.307 – 3.631)
rs1821777	T/A	0.464	0.359	0.0006	1.673 (1.249 – 2.240)	38/71/28	195/198/66	0.0011	2.587 (1.405 – 4.763)	2.237 (1.387 – 3.609)
rs1624395	G/A	0.511	0.417	0.0015	1.632 (1.206 – 2.209)	27/81/30	154/220/79	0.0016	2.626 (1.391 – 4.958)	2.469 (1.464 – 4.163)
rs1370128	C/T	0.536	0.431	0.0005	1.709 (1.264 – 2.311)	26/75/36	147/220/85	0.0017	2.964 (1.593 – 5.514)	2.204 (1.295 – 3.751)
rs2118137	C/G	0.290	0.320	0.4341	0.879 (0.637 – 1.214)	67/62/9	210/204/45	0.6161	0.666 (0.296 – 1.499)	0.962 (0.629 – 1.470)
rs289068	A/G	0.213	0.229	0.3360	0.823 (0.554 – 1.223)	83/48/5	271/166/22	0.6246	0.638 (0.203 – 2.007)	0.840 (0.519 – 1.359)
rs3741604	A/G	0.269	0.336	0.0226	1.475 (1.056 – 2.060)	72/52/10	195/214/46	0.0481	1.781 (0.816 – 3.889)	1.065 (0.482 – 2.354)
rs1168314	T/C	0.293	0.328	0.4325	0.879 (0.636 – 1.214)	67/61/10	204/210/46	0.7142	0.728 (0.331 – 1.599)	0.912 (0.595 – 1.397)

a. Il p-value è stato calcolato attraverso la regressione logistica.

b. I valori in grassetto indicano la significatività dopo la correzione di Bonferroni.

Tabella 6. Analisi Caso-Controllo degli aplotipi nel gene *IRAK-M* nel campione sardo.

Aplotipi	Frequenza		P	P empirico (10 ⁵ permutazioni)	OR (95% CI)
	Casi N = 139	Controlli N = 460			
CGC	0.464	0.568	0.0022	0.0101	Reference
TAT	0.460	0.356	0.0018	0.0081	1.73 (1.24 – 2.40)
CAT	0.051	0.058	0.5982	0.9759	1.13 (0.35 – 3.60)
CGT	0.026	0.017	0.3454	0.3454	2.31 (0.83 – 6.45)
Effetti Likelihood ratio test per l'aplotipo globale				$\chi^2 = 14.26$ (df = 4), p=0.0065	

Gli aplotipi sono definiti da tre SNPs tag rs11465955, rs1624395, rs1370128. I p-values sono stati calcolati attraverso il likelihood-ratio test.

Per accertare se il picco di linkage poteva essere spiegato attraverso la presenza dell'aplotipo di rischio all'interno del gene *IRAK-M*, abbiamo condotto un'analisi di linkage nel campione iniziale di 100 famiglie, usando i marcatori microsatelliti localizzati sotto il picco di linkage. Escludendo i sibs che condividevano l'aplotipo di rischio, il massimo LOD score (MLS) diminuiva drammaticamente da 1.93 a 0.30 al marcatore D12S75. Questa analisi ha anche messo in evidenza che il valore di LOD score relativo ai 64 sibs che condividono l'aplotipo di rischio e' simile a quello osservato per l'intero campione (MLS1.70), indicando che il linkage nella regione è interamente dovuto alla presenza dell'aplotipo di linkage all'interno del gene *IRAK-M* (Figura 2).

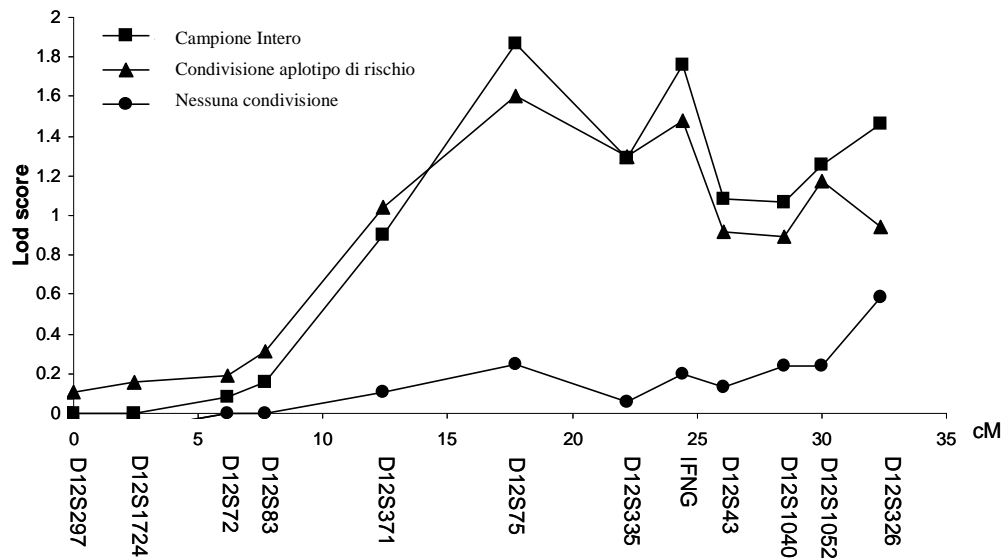


Figura 2. Analisi di linkage relativa alla presenza dell'aplotipo di rischio utilizzando i microsatelliti localizzati nella regione dal 12q13.3 a12q21.1. Il LOD score dei 64 sibs che condividono l'aplotipo di rischio (MLS 1.70) è simile a quello dell'intero campione (MLS 1.93), mentre l'andamento della curva nel campione di sibs che non condivide l'aplotipo di rischio si abbassa drammaticamente al marcatore D12S75 (MLS= 0.30).

4.3 Replica dell'analisi di associazione in una popolazione indipendente.

Per verificare se *IRAK-M* poteva essere associato con l'asma in un'altra popolazione abbiamo condotto uno studio caso-controllo, in un gruppo di individui affetti da asma allergico proveniente dall'Italia del nord (Tabella 4). A questo scopo abbiamo analizzato in questa popolazione gli stessi SNPs che nella popolazione sarda definivano gli aplotipi predisponenti e protettivi nell'analisi del TDT (rs2870784, rs1177578, rs2141709, rs11465955, rs1624395, e rs1370128) (Tabella 7).

Questa popolazione, come quelle europee, è geneticamente distante da quella sarda e studi precedenti hanno messo in evidenza linkage in un campione di famiglie con asma atopico intorno al marcatore D12S390, con un MLD=2.81 (42). Questo marcatore si trova nella stessa regione che noi abbiamo analizzato.

I risultati mostrano una associazione significativa a livello allelico in particolare per due SNPs all'interno del gene *IRAK-M*, rs1624395 e rs1370128, rispettivamente con $p=0.04$ e $p=0.02$ che si mantengono significativi anche dopo la correzione di Bonferroni (Tabella 8A e 8B). Questo risultato è stato validato anche dall'analisi del genotipo. La popolazione sarda e quella italiana presentano quindi gli stessi alleli associati del gene *IRAK-M* e frequenze simili dei più comuni aplotipi (Tabella 8A e 8B).

Tabella 7. Studio Caso controllo in un campione italiano usando i sei SNPs tag identificati nel campione sardo e usati nell'analisi del TDT.

SNP	Allele 1/2	Allele 2 frequenza		Allele 2 verso Allele 1		Genotipi			
		Casi	Controlli	P	OR (95% C.I.)	Casi	Controlli	P	OR (95% C.I.)
rs2870784	G/T	0.189	0.251	0.079	1.44 (0.89 –2.32)	45/17/4	155/106/17	0.624	0.99 (0.32 –3.05)
rs1177578	G/C	0.371	0.415	0.203	1.20 (0.81 –1.78)	27/29/10	98/129/51	0.341	0.79 (0.38 –1.66)
rs2141709	G/A	0.227	0.331	0.012	1.68 (1.08 –2.62)	40/22/4	127/118/33	0.122	0.48 (0.16 –1.40)
rs11465955	C/T	0.432	0.339	0.029	1.48 (1.01 –2.18)	23/29/14	122/117/34	0.055	1.89 (0.95 –3.78)
rs1624395	G/A	0.529	0.401	0.004	1.68 (1.15 –2.46)	18/27/22	98/137/43	0.002	2.67 (1.46 –4.89)
rs1370128	C/T	0.553	0.412	0.002	1.76 (1.21 –2.58)	15/30/22	95/136/46	0.003	2.45 (1.35 –4.47)

Gli SNPs in grassetto sono quelli che mostrano la più alta associazione e sono localizzati all'interno del gene *IRAK-M*. Nella colonna dei genotipi sono indicati il numero dei genotipi nei casi rispetto ai controlli.

Tabella 8.

A. Frequenze degli aplotipi individuati dai 6 SNPs tag nei pazienti asmatici sardi mediante il TDT.

Aplotipi				
G G G T A T	0.385	61:28	0.0005	0.0011
G C A C G C	0.277	23:46	0.0057	0.0282
T G G C G C	0.165	31:22	0.2163	0.8403
G C G C A T	0.057	7:16	0.0587	0.3274

B. Frequenze degli aplotipi individuati dai 6 SNPs tag nei pazienti asmatici italiani attraverso un'analisi caso controllo.

rs2870784	rs1177578	rs2141709	rs11465955	rs1624395	rs1370128	Frequenza
G	G	G	T	A	T	0.33950
G	C	A	C	G	C	0.28680
T	G	G	C	G	C	0.22996
G	C	G	C	A	T	0.05300

Gli aplotipi identificati dai 6 SNPs tag nel caso controllo italiano hanno una frequenza maggiore del 5% e sono gli stessi di quelli osservati dall'analisi del campione sardo.

4.4. Analisi mutazionale del gene *IRAK-M*.

Il gene *IRAK-M* è costituito da 12 esoni, mappa in un intervallo di ~60 Kb nella regione 12q14.3, codifica per una proteina di 596 amminoacidi, con un peso molecolare di 68 KDa, ed è altamente espresso nei monociti-macrofagi.

La proteina *IRAK-M* appartiene alla famiglia *IRAK* e come tale contiene un death domain N-terminale conservato, seguito da un dominio chinasi centrale e da una sequenza unica di amminoacidi nella porzione C-terminale. Le proteine della famiglia *IRAK* sono molto importanti nella mediazione del segnale fra recettori di membrana di tipo TLR/IL-1R e fattori di trascrizione a valle, come NF- κ B che inducono la trascrizione di geni pro-infiammatori (43). *IRAK-M* svolge un ruolo importante nella regolazione della via del segnale dell'immunità innata. Kobayashi e collaboratori hanno proposto che *IRAK-M*, che non ha attività di fosforilazione, agisca come regolatore negativo della via dei TLR/IL-1R. In particolare è stato suggerito che *IRAK-M* inibisca la fosforilazione e la dissociazione di *IRAK-1* dal complesso recettore-adattatore portando così ad una interruzione del segnale a valle (41).

Per vedere mutazioni nel gene *IRAK-M* erano associate all'asma allergico, abbiamo sequenziato tutti gli esoni così come le giunzioni introne-esone del gene in 100 individui affetti, selezionati da tutte le famiglie in studio. Questa analisi ha portato all'identificazione di sette variazioni di sequenza in 10 differenti famiglie (Tabella 9). Non abbiamo trovato queste mutazioni nei 100 controlli sani che sono stati analizzati mediante dot blot.

Due mutazioni di particolare rilievo sono state trovate nelle famiglie A e B. Nella famiglia A abbiamo trovato una mutazione nonsense in posizione 227 dell'esone 2, c227G>A, che genera un codone di stop in corrispondenza dell'aminoacido triptofano conservato in posizione 76

(W76X) situato nel death domain della proteina. Il codon stop potrebbe determinare la degradazione dell'mRNA o generare una proteina trunca che avrebbe solo la parte C-terminale come conseguenza di uno slittamento della lettura che inizia a partire da un ATG a valle (44).

Nella famiglia B abbiamo trovato una mutazione nel sito di splicing G→T in posizione +1 del sito donatore di splicing dell'esone 3. La sostituzione G→T a questo sito potrebbe colpire severamente la proteina che, come conseguenza di uno slittamento della lettura, potrebbe generare una proteina trunca di 137 aminoacidi costituita dal death domain e da una piccola sequenza aminoacidica terminale (VEYCIENEP). Entrambe le mutazioni sono coereditate con l'aplotipo di rischio predisponente (TAT) e sono associate con l'insorgenza precoce di asma. L'analisi mutazionale ha anche identificato cinque mutazioni "missenso" che cambiano l'amminoacido nella proteina. Fra queste, la mutazione P22L cade nel death domain e L400V e R429Q nel dominio chinasi. Queste mutazioni potrebbero avere una rilevanza funzionale se dovessero modificare la struttura della proteina. Come ci si può aspettare per una malattia multifattoriale non abbiamo osservato correlazione tra gravità dell'asma e presenza di mutazioni.

Tabella 9. Mutazioni della regione codificante del gene irak-m nei pazienti asmatici sardi.

Tipo di mutazione	Esone	Sostituzione Aminoacidica	Posizione Nucleotidica	Famiglia	Mutazione nei sibs ^a	Aplotipo di Predisposizione ^b	Età di esordio
Nonsense	2	p.W76X	c.227G>A	A	+	+/+	≤ 13
					+	+/+	≤ 13
Sito di splicing	IVS 3	Splicing aberrante	IVS3+1G>T	B	+	+/+	≤ 13
					+	+/+	≤ 13
					-	+/+	≤ 13
Missenso	1	p.P22L	c.65C>T	C	+	-/-	≤ 13
					-	-/-	≤ 13
	1	p.P22L	c.65C>T	D	+	-/-	>13
					+	-/-	>13
					-	+/-	>13
	3	p.P111A	c.331C>G	E	+	+/+	>13
					+	+/+	>13
					-	+/-	>13
					-	+/-	>13
	4	p.V134M	c.400G>A	F	+	-/-	≤ 13
					+	-/-	≤ 13
	11	p.L400V	c.1198C>G	G	+	-/-	≤ 13
					+	-/-	≤ 13
	11	p.L400V	c.1198C>G	H	+	+/-	>13
	11	p.L400V	c.1198C>G	I	+	+/-	≤ 13
					+	+/-	≤ 13
	11	p.R429Q	c.1286G>A	L	+	-/-	>13
					-	-/-	>13

a. In alcune famiglie la stessa mutazione è stata trovata in entrambi i fratelli sib(+). b. In alcune famiglie le mutazioni sono state trovate in individui omozigoti (+/+) ed eterozigoti (+/-) per l'aplotipo predisponente.

4.5. Studi di espressione

Studi precedenti hanno dimostrato che *IRAK-M* è altamente espresso nei monociti, rispetto a bassi livelli di espressione in altri tessuti. Ma recenti lavori hanno suggerito uno specifico ruolo di IRAK-M nel polmone, nella via dell'immunità innata. E' stato dimostrato che il topo knockout *Irak-M*^{-/-} con sepsi, risponde alle infezioni batteriche producendo elevati livelli di citochine infiammatorie e chemochine con reclutamento di neutrofili nelle vie aeree (45). E' noto che le cellule di questo tipo sono coinvolte nella risposta esagerata che caratterizza l'asma. Questo risultato suggerisce uno ruolo specifico di IRAK-M nel polmone come regolatore dell'infiammazione e delle risposte immunitarie innate.

Quindi abbiamo esteso studi di espressione a biopsie di polmone di donatori sani tramite esperimenti di immunoistochimica per valutare l'espressione di IRAK-M (Figura 3). L'immunoistochimica con l'anticorpo contro IRAK-M mostra che questa molecola è espressa nel polmone sia a livello dei macrofagi così come nelle cellule epiteliali bronchiali e alveolari (Figura 3A). Per vedere in quali cellule dell'epitelio bronchiale fosse precisamente espresso IRAK-M abbiamo condotto esperimenti di immunoistochimica utilizzando un anticorpo diretto contro TTF1, un marcatore dei pneumociti di tipo II (Figura 3B).

I pneumociti di tipo II sono cellule voluminose di struttura cuboide le quali ricoprono circa il 5% della superficie alveolare. Sebbene poco numerosi, sono cellule di notevole importanza nella funzionalità del polmone, poiché sono responsabili della secrezione del surfattante, composto glico-proteico che abbassa la tensione superficiale e favorisce gli scambi gassosi, e sono anche implicate nelle risposte immunitarie innate. La colorazione ha confermato che IRAK-M è espresso da questo tipo di cellule. Poiché IRAK-M fa parte di una via la cui tappa finale è la

traslocazione dal citoplasma al nucleo del fattore nucleare NF- κ B, il quale regola la trascrizione dei geni codificanti citochine, chemochine ed altri fattori immunomodulanti abbiamo eseguito l'immunoistochimica utilizzando un anticorpo contro la subunità p-65 di NF- κ B (46). In accordo con lavori precedenti abbiamo osservato alti livelli di NF- κ B attivato nelle cellule epiteliali, nei bronchi e negli alveoli (Figura 3C). Quindi *IRAK-M* è espresso nelle cellule epiteliali nelle vie aeree. In particolare l'espressione nei pneumociti di tipo II lo rende un ottimo candidato per un più estensivo coinvolgimento nella funzione polmonare.

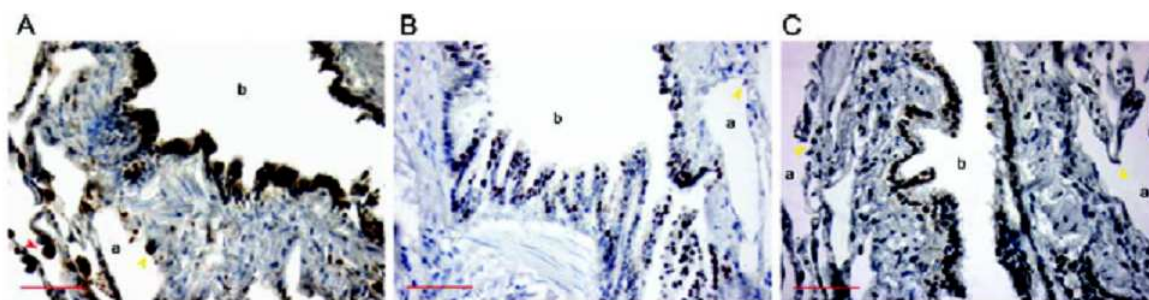


Figura 3. Localizzazione di IRAK-M in biopsie di polmone di donatori sani attraverso esperimenti di immunoistochimica. A) L'espressione di IRAK-M è evidente nell'epitelio bronchiale; B) Con l'anticorpo TTF1 abbiamo localizzato l'espressione nei pneumociti di tipo II; C) Espressione di NFκB attivato, nelle cellule dell'epitelio bronchiale.

5. Discussione

L'asma è una malattia complessa di grossa rilevanza per la salute pubblica, per la quale a tutt'oggi sono stati identificati pochi geni di predisposizione. Per isolare nuovi geni coinvolti in questa patologia abbiamo iniziato uno studio genetico nella popolazione sarda, che ha le caratteristiche ideali per semplificare lo studio di malattie complesse.

Il lavoro descritto in questa tesi ha portato all'identificazione di un nuovo gene di suscettibilità, *IRAK-M*, che potrebbe avere un ruolo cruciale nella fisiopatologia dell'asma allergico, visto il suo coinvolgimento nei processi che regolano l'infiammazione e l'attivazione della risposta immunitaria innata. Per raggiungere questo risultato è stato fondamentale l'aver ridotto l'eterogeneità genetica della popolazione in studio stratificando il campione in base all'età di esordio della malattia (prima e dopo i 13 anni), partendo dal presupposto che ad una omogeneità fenotipica sarebbe corrisposta anche una omogeneità genetica. Esistono infatti distinzioni nel processo della malattia tra bambini ed adulti, che dipendono da differenze anatomiche e funzionali. La crescita dei polmoni durante l'infanzia, come pure i cambiamenti della funzione polmonare negli adulti sono di capitale importanza nell'espressione della malattia

asmatica (47). Infatti, quando abbiamo fatto la prima analisi di linkage sulle 100 famiglie affette da asma allergico, abbiamo ottenuto un valore di LOD score più basso rispetto a quello ottenuto dopo la stratificazione del campione. Questo risultato indicava che il gene presente nel sottogruppo di pazienti che contribuiva maggiormente al linkage, era implicato nell'insorgenza precoce di asma. Diversi geni localizzati nell'intervallo di confidenza erano dei buoni candidati per la suscettibilità all'asma. Infatti, l' *IFN- γ* era stato trovato in associazione in un campione costituito da bambini con asma atopico, l'*IL-22* e l'*IL-26* anch'esse erano state implicati nell'asma. L'analisi mutazionale di questi tre geni non ha evidenziato alcuna mutazione, per cui abbiamo focalizzato la nostra attenzione su un altro gene candidato per funzione localizzato nella stessa regione cromosomica, *IRAK-M*. Questo gene codifica per una proteina la cui funzione ben si inseriva nel meccanismo patogenetico dell'asma allergico. Infatti IRAK-M fa parte della via di trasduzione dei Toll-Like-Receptors, il cui ruolo è cruciale nell'attivazione della risposta immune innata ed adattativa. Recenti studi hanno dimostrato che l'attivazione dei TLRs può indurre l'attivazione di citochine di tipo Th2 e lo sviluppo di asma (48). In una regione di 387 Kb abbiamo analizzato 22 SNPs mediante il TDT e uno studio caso-controllo dimostrando che, all'interno del gene *IRAK-M*, 3 SNPs individuano l'aplotipo predisponente che è associato con l'asma ad esordio precoce. Tale risultato è stato replicato in una popolazione indipendente nella quale erano stati ottenuti, precedentemente, risultati di linkage significativi nella stessa regione in un campione di bambini asmatici con atopia. Per valutare se vi erano variazioni nucleotidiche nella regione codificante del gene abbiamo sequenziato 100 pazienti ed abbiamo evidenziato la presenza di mutazioni in un sottogruppo di famiglie asmatiche ma non nei controlli. Queste mutazioni suggeriscono che un malfunzionamento o assenza della proteina può avere delle conseguenze importanti nello sviluppo dell'asma allergico. Già Kobayashi e collaboratori avevano dimostrato che nel topo knock-out per *Irak-*

M, espresso nei monociti - macrofagi, mediante la stimolazione dei TLRs si osservava un incremento dell'infiammazione in risposta alle infezioni batteriche. Studi recenti hanno inoltre dimostrato che il topo knock-out *Irak-M*^{-/-} con sepsi, risponde alle infezioni batteriche producendo elevati livelli di citochine infiammatorie e chemochine con reclutamento di neutrofili nelle vie aeree. E' noto che le cellule di questo tipo sono coinvolte nelle esacerbazioni che caratterizzano l'asma. Abbiamo voluto verificare se IRAK-M potesse essere espressa non solo nei monociti ma anche nelle cellule dell'epitelio polmonare visto che le vie aeree sono quelle che vengono per prime a contatto con l'allergene e nelle quali si innesca la risposta innata. Mediante esperimenti di immunoistochimica abbiamo dimostrato l'espressione di IRAK-M nei pneumociti di tipo II. Queste cellule giocano un ruolo chiave nella funzione del polmone e nella difesa della immunità innata e possono essere coinvolte nei cambiamenti delle vie aeree indotte dall'allergene in risposta a patogeni e malattie del polmone. Inoltre, in queste cellule, a livello dell'epitelio bronchiale, abbiamo dimostrato un'elevata attivazione di NF-κB. Sulla base dei nostri risultati e da osservazioni precedenti abbiamo proposto la via attraverso la quale IRAK-M è implicato nell'eziologia dell'asma. IRAK-M interviene criticamente nel modulare l'attivazione di NF-κB e nelle risposte infiammatorie a valle. Se la sua funzione è diminuita o compromessa, la continua overproduzione di citochine infiammatorie nel polmone in risposta alle infezioni o allergeni può portare a risposte Th2 mediate o e/o Th1 dipendenti (Figura 4). Molti studi si sono focalizzati sul ruolo dei TLR e sui componenti della loro via di segnale nel controllo della regolazione delle risposte adattative Th1 e risposte Th2, soprattutto attraverso l'uso dei topi knock-out *TLR*^{-/-}. I risultati di questi studi sono controversi ma vi sono evidenze che i TLRs possono essere importanti non solo per le risposte di tipo Th1 ma anche nelle risposte di tipo Th2.

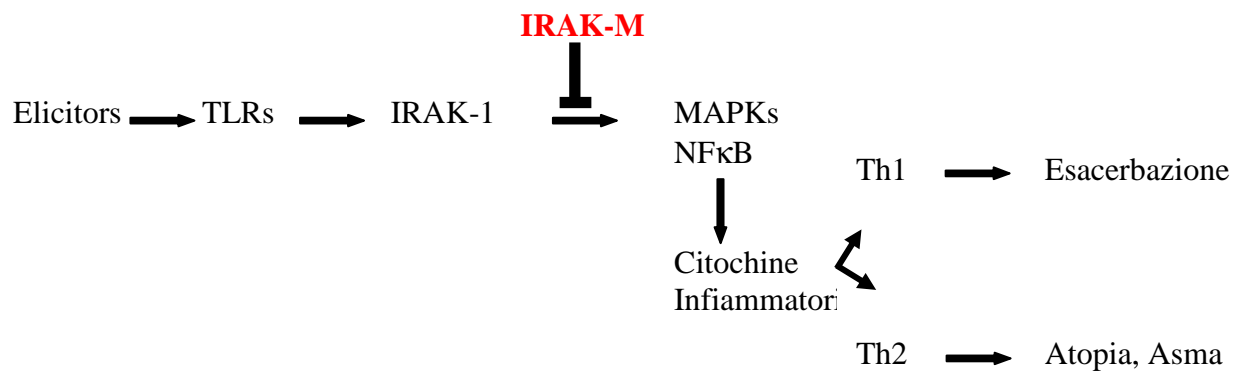


Figura 4. La figura mostra il meccanismo attraverso il quale IRAK-M interviene nel regolare la risposta infiammatoria ad agenti patogeni che sono riconosciuti dai Toll-like-Receptors (TLRs) nei macrofagi alveolari e nelle cellule epiteliali del polmone. Il riconoscimento innesca la formazione del complesso adattatore-recettore che comprende IRAK-1, IRAK-4 e MyD88. Il rilascio di IRAK-1, dal complesso del segnale porta all'attivazione delle MAPKs e infine di NF-κB che regola la trascrizione di geni che codificano per citochine infiammatorie che possono influenzare la differenziazione delle cellule T naive in Th2 o Th1. IRAK-M agisce inibendo la via di traduzione del segnale, ripristinando l'omeostasi. Secondo il modello proposto, se la sua funzione è alterata, l'eccessiva stimolazione dei TLRs può portare allo sviluppo di asma atopico o all'esacerbazione della risposta alle infezioni e agli allergeni.

6. Conclusioni

Il nostro studio ha portato all'identificazione di un nuovo gene (49) di predisposizione all'asma allergico ed in futuro il proseguimento delle analisi tuttora in corso porterà alla scoperta di altri geni implicati nella patologia. La conoscenza dei geni importanti nell'iniziazione e nella storia naturale dell'asma è preziosa soprattutto se potrà essere utilizzata per prevenire la patologia, migliorare la cura dei pazienti o per prevedere la risposta al trattamento. La migliore comprensione delle vie alterate nella fisiopatologia dell'asma attraverso la conoscenza delle basi genetiche della malattia, potrebbe permettere di individuare nuovi bersagli farmacologici o indicatori della risposta al trattamento, al fine di fornire al paziente un'auspicabile cura specifica e personalizzata.

7. Materiali e metodi

7.1. Campione

Il campione analizzato è costituito da famiglie selezionate secondo criteri ben precisi:

- Raccolta di famiglie con due o più fratelli affetti per poter condurre l'analisi di linkage secondo l'approccio ASP.
- Origine sarda da tre generazioni
- Esclusione bambini di età <6 anni per evitare possibili fenocopie.

I pazienti sono stati reclutati da tutte quattro le province attraverso la ricerca di informazioni dagli archivi e dalle cartelle cliniche. La provenienza geografica delle famiglie in studio è proporzionale al numero di abitanti in ciascuna delle quattro province sarde.

Tutti i soggetti affetti in studio, sono stati selezionati anche secondo accurati criteri diagnostici:

- Diagnosi di asma fatta dal Clinico secondo la definizione dell'American Thoracic Society.
- Prick test positivi per comuni allergeni e dosaggio delle IgE sieriche per valutare l'atopia.

Tutti i pazienti sono pertanto asmatici allergici. I pazienti con esordio precoce di asma sono stati intervistati dai medici circa la persistenza dell'asma dopo la fine della pubertà (18 anni). La percentuale degli affetti di sesso maschile è maggiore rispetto a quella di soggetti femminili (64,4 % rispetto a 35,6 %), rispecchiando le proporzioni descritte negli studi epidemiologici sui soggetti in età pediatrica. La maggior parte dei pazienti in studio presentano asma intermittente, il 33,9% inquadrato nel 1° livello di gravità e asma severo persistente il 26,8 % inquadrati nel 4° livello di gravità.

7.2. Il campione di replica.

Il campione di replica è costituito da 345 individui (67 casi e 278 controlli sani) tra loro non imparentati selezionati da un gruppo di famiglie asmatiche. L'età di insorgenza della malattia di questi pazienti non è nota per cui sono stati considerati tutti gli individui atopici con una persistenza dell'asma a 18 anni. Tutte le famiglie provengono dalla clinica pediatrica dell'Università di Verona e dall'ospedale di Bolzano. La definizione del fenotipo è stata fatta mediante un questionario modificato dell'American Thoracic Society, mediante la diagnosi del medico, test allergometrico a un pannello di allergeni e test di iperresponsività bronchiale con il test della metacolina.

7.3. Aspetti etici.

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico e ciascun partecipante allo studio ha firmato un appropriato consenso informato.

7.4. Estrazione del DNA

Il DNA è estratto dai leucociti del sangue periferico usando 5 ml di sangue prelevato in EDTA. La metodica utilizzata per l'isolamento del DNA è l'estrazione salina che prevede l'utilizzo di una serie di soluzioni che in ordine hanno la funzione: di allontanare i globuli rossi, lisare la membrana cellulare e nucleare dei globuli bianchi. Il campione viene sottoposto a digestione con proteinase K per l'eliminazione di tutti i residui proteici. Successivamente si ha una precipitazione con NaCl iper-saturo. Il DNA viene infine precipitato con isopropanolo, lavato con etanolo al 70% e risospeso in Tris-EDTA. I volumi dei reagenti usati variano in funzione del volume di sangue di partenza. La

concentrazione e la qualità di DNA estratto è determinata attraverso lettura spettrofotometrica.

7.5. Stima della concentrazione del DNA

Per calcolare la concentrazione di DNA estratto, è stato utilizzato il metodo spettrofotometrico, in grado di valutare la quantità di radiazioni UV assorbite dalle basi dell'acido nucleico. La misura della concentrazione viene eseguita allo spettrofotometro utilizzando una lunghezza d'onda di 260 nm. La purezza del campione si valuta calcolando il rapporto tra la densità ottica (OD) a 260 nm e la OD a 280 nm: il valore ottimale deve essere compreso tra 1.5 e 1.8; un valore inferiore indica la presenza di contaminazione.

7.6. Polimerase Chain Reaction (PCR)

I marcatori selezionati per l'analisi di linkage sono stati studiati tramite amplificazione, con l'impiego di oligonucleotidi specificatamente disegnati in prossimità della sequenza ripetuta. La scelta degli oligonucleotidi è fondamentale per avere una buona efficienza ed una alta specificità della PCR. Gli oligonucleotidi utilizzati sono marcati con fluoro cromi ed hanno lunghezza differente. I prodotti dell'amplificazione di vari marcatori di uno stesso individuo sono stati raccolti in pool costituito da una decina di marcatori che sono stati analizzati contemporaneamente senza interferire l'uno con l'altro.

Le PCR disposte in pool e in piastra sono state purificate con il Sephadex, ad esse è stata unita un'aliquota di un marcatore di peso molecolare noto (ET ROX 400). La separazione dei frammenti di PCR è stata fatta mediante corsa elettroforetica all'interno dei capillari sul sequenziatore automatico MegaBACE.

Le amplificazioni sono state eseguite in un volume finale di 13 µl con il seguente sistema:

- 26 ng di DNA genomico;
- 0,5 U di Taq Gold;
- 1,5 mM $<[MgCl_2]>$ 3 mM
- 4,3 pmoli di primer forward e reverse
- 0,2 mM di dNTPs
- 10 mM di TrisHCl e 50 mM di KCl (buffer 1X)

Nel nostro studio abbiamo utilizzato la Taq Gold per la sua alta specificità ed efficienza di amplificazione. La Taq Gold è costituita da un dominio sintetico e da una attività 5'esonucleasica (capacità di aggiungere i dNTPs complementari al filamento stampo alla catena in formazione). Questa Taq ha una variazione puntiforme nella sequenza grazie alla quale l'attività è rilasciata termicamente in modo progressivo.

7.7. Genotipizzazione dei marcatori microsatelliti

I marcatori per la genotipizzazione del DNA delle famiglie, sono stati scelti dal sito della Marshfield Center for Medical Genetics e Ensembl Genome Browser (Tabella 10). La maggior parte dei microsatelliti scelti sono tetranucleotidi; i dinucleotidi infatti hanno un più' alto tasso mutazionale; inoltre l'eterozigosità pubblicata è stata calcolata sul campione sardo. L'eterozigosità media dei marcatori nel nostro campione è di $0,77 \pm 0,05$ mentre quella pubblicata nei siti è di $0,75 \pm 0,05$. La distanza media è di circa 10 cM.

I campioni sono stati genotipizzati, mediante un software, Genetic Profiler, che analizza i dati raccolti e li elabora come "picchi" di colore, forma e grandezza diversa, distintive di ogni marcatore. Le famiglie vengono analizzate per i marcatori scelti assegnando gli alleli ad un

determinato locus e verificandone la trasmissione parentale. Viene quindi prima assegnato il genotipo ai genitori e poi si verifica che gli alleli vengano trasmessi ai figli. I marcatori possono essere visualizzati come singolo picco se l'individuo è omozigote per quel marcatore o come due picchi se è eterozigote.

Nel caso in cui la trasmissione non soddisfa le condizioni mendeliane si ripete la procedura sperimentale per escludere eventuali errori come per esempio uno scambio di campioni. La conferma di una trasmissione non mendeliana può essere allora dovuta o alla presenza di polimorfismi nel sito bersaglio dell'oligonucleotide (che non consente l'amplificazione di uno degli alleli) o a delle mutazioni insorte ex-novo per slittamento della polimerasi lungo la sequenza ripetuta.

Tabella 10. Marcatori microsatelliti genotipizzati per l'analisi di Linkage Multipoint sul cromosoma 12q 13-24.

Marcatori	cM	Fluorocromo		Oligonucleotidi
D12S297	0.0	HEX	F	GTTTGGTATTGGAGTTTTCAG
			R	AAATCATCAGTGGAGTTAGCA
D12S1724	2.4	TET	F	CTCTGGAGGCTGAGGTGG
			R	ATCCGTGCTGGTTCTATCTGTGTA
D12S72	6.2	TET	F	CATCATCCCATGGTCGAAG
			R	GAGAGTAGGTTCCCTTATCCTGGG
D12S83	7.7	TET	F	TTTTTGGAAGTCTATCAATTTGA
			R	TAGCAGAGAAAGCCAATTCA
D12S371	12.3	FAM	F	AAACCACACAAAGCCTCCAG
			R	TGATGACAGGCTCAAGCG
D12S75	17.6	FAM	F	GTGGCTCTAAAGCATGACCA
			R	ATTTCTTCCACCTGCATGAT
D12S335	22.2	NED	F	TCATCCAGGCTTCACC
			R	GTTTCTTTGGCAAGGACAGACACA
IFNG	24.3	HEX	F	GCTGTTATAATTATAGCTGTC
			R	GTTTCTTCTACTGTGCCTTCCTGTAG
D12S43	26.0	FAM	F	AATGTCCTTGTACTTAGGAT
			R	CACTTAATATCTCAATGTATAC
D12S1040	28.4	TET	F	TATGACAGGATGAACAAAAACG
			R	AAATTGAATTTGATTCTTCATAGC
D12S1052	29.9	HEX	F	ATAGACAGGCTGGATAGATAGACG
			R	AGTGTGATATGAATAATGAGCTGC
D12S326	32.3	HEX	F	CCCAGCAGTGCTAGTGTTGA
			R	GTTTCTTGGGCTAGGGTGGAGAATCAA
D12S1064	39.6	TET	F	ACTACTCCAAGGTTCCAGCC
			R	AATATTGACTTTCTCTTGCTACCC
D12S311	40.9	HEX	F	CCAAACATTAAGTGTCC
			R	GTTTCTTGTGCCCTGAGCAACTG
D12S1300	44.6	HEX	F	CCTCACACAATGTTGTAAGGG
			R	TGTAACATCCGTGATTAATAATAGC
PAH	48.6	TET	F	GCCAGAACAAGTGTGCTGGTTC
			R	AATCATAAGTGTTCACAGAC
D12S78	54.7	FAM	F	CTTTCAGCACCATGTATTT
			R	ACTGCTGGCTTTAACAGAAA

7.8. Analisi dei marcatori SNPs

I marcatori SNPs sono stati selezionati dal dbSNP, The SNP Consortium, e Ensembl Genome Browser e sono stati selezionati secondo vari criteri quali per esempio l'eterozigosità e la localizzazione nella regione cromosomica di interesse (regione codificante > intragenica > intergenica). L'eterozigosità degli SNP è stata confermata

nella popolazione sarda tramite il sequenziamento di 8 campioni provenienti dalle 4 province dell'isola.

Gli SNPs sono stati analizzati tramite la tecnica del DOT BLOT. Il DNA è stato amplificato e fissato su un filtro di nitrocellulosa, tramite un apparato multi-pozzetto a vuoto, che consente il caricamento uniforme e rapido, in un unico filtro, di molti campioni. Il filtro è stato ibridato con gli oligonucleotide marcati con fosforo ^{32}P radioattivo. Dopo fissaggio del DNA denaturato, il filtro, è stato inizialmente pre-ibridato per bloccare i siti sulla membrana che potrebbero legare la sonda marcata e produrre background, e successivamente ibridato in specifiche condizioni di temperatura, agitazione e pH con la soluzione contenente la sonda marcata. Dopo una notte di ibridazione il filtro è stato sottoposto ad una serie di lavaggi, per rimuovere l'eccesso di sonda.

7.9. Analisi statistica

La qualità dei dati derivanti dalla genotipizzazione è stata controllata, valutando in primo luogo l'ereditarietà mendeliana degli alleli dei marcatori utilizzati all'interno delle famiglie e successivamente mediante il test dell'equilibrio di Hardy - Weinberg. Questo ultimo è stato testato mediante il programma PEDSTATS (50) su un gruppo di soggetti non correlati, estrapolati dalle famiglie.

L'analisi di linkage non parametrica è stata basata sulla cosiddetta ASP analysis (analisi degli affected sib pairs) che verifica se la distribuzione di probabilità che le coppie di fratelli affetti condividano 0, 1 o 2 alleli IBD (identici per discendenza) sia significativamente diversa dalla distribuzione attesa in assenza di linkage. L'analisi è un'analisi multipoint cioè estesa per ogni punto della regione 12q13-24 studiata.

A questo scopo è stato utilizzato il programma GENEHUNTER (51), che ha fornito anche i risultati per altre procedure correlate all'analisi di

linkage, come per esempio la stima delle probabilità di condivisione degli alleli identici per discendenza (IBD).

Le sibship contenenti più di una coppia di fratelli affetti (è il caso di nove famiglie) sono state considerate come coppie indipendenti.

Per l'analisi di linkage del campione stratificato, l'analisi è stata condotta su 2 sub-gruppi di coppie di fratelli affetti selezionati in base all'età d'esordio. Nel primo gruppo ad età d'esordio precoce erano selezionati esclusivamente coppie concordanti per l'età d'esordio ≤ 13 anni; nel secondo erano inclusi fratelli concordanti e discordanti per l'età d'esordio > 13 anni.

L'ordine dei microsatelliti e le distanze tra i marcatori sono state derivate da un'analisi tramite il programma CRIMAP (52), dopo aver controllato la localizzazione fisica dei marcatori tramite l'Ensembl Genome Browser.

L'analisi di associazione degli SNP con l'asma è stata effettuata con 2 approcci diversi: il TDT (53) ed il caso-controllo.

L'analisi di associazione nel campione familiare è stata testata con il classico TDT (Transmission disequilibrium test) sia per i singoli marcatori che per gli aplotipi estesi. Questo test viene utilizzato per verificare se un dato allele/aplotipo viene trasmesso da un genitore eterozigote più spesso di quanto ci si aspetti da una trasmissione random; in questo caso sono stati analizzati soltanto nuclei familiari costituiti da padre, madre ed un figlio affetto, cioè il probando. Il programma utilizzato per il calcolo del TDT, UNPHASED (54), utilizza un test basato massima verosimiglianza. Per valutare la significatività dei risultati del TDT, corretta dal bias derivante impiego di test multipli, si è fatto uso di una procedura di permutazione. Utilizzando gli stessi dati genotipici del nostro campione, ma riassegnando a caso gli alleli come

trasmessi o non trasmessi, si derivano le probabilità empiriche, cioè la probabilità che il risultato ottenuto dal test sia dovuto dal caso.

Lo studio caso-controllo, per verificare se le frequenze dei marcatori genetici siano statisticamente differenti tra il campione dei soggetti affetti da asma persistente ad esordio precoce e quello dei soggetti sani, è stato effettuato mediante regressione logistica ed eseguito sia a livello allelico, che genotipico. A questo scopo sono stati selezionati un soggetto affetto con queste caratteristiche da ciascuna famiglia, in totale 139 soggetti, per assicurare che i casi non fossero correlati tra di loro e 460 soggetti sani. Questa analisi ha permesso di calcolare gli odds ratio ed il corrispondente intervallo al 95%, associati sia ai genotipi che agli alleli di rischio e utilizzando come covariate età e sesso in tal modo correggendo per l'effetto di queste variabili. I valori di p sono stati aggiustati per test multipli mediante la correzione di Bonferroni, in modo tale da mantenere il livello di errore al 5%. Inoltre è stato effettuato un test con il programma THESIAS (55) per valutare l'effetto dell'aplotipo di rischio sulla malattia, correggendo per il contributo delle variabili confondenti sesso ed età.

L'analisi per l'identificazione dei blocchi di Linkage Disequilibrium (LD) e la distribuzione degli aplotipi costituiti dagli SNP tag sia all'interno del gene *IRAK-M* che nella regione genomica circostante è stata condotta mediante il programma HAPLOVIEW (56).

Per il caso-controllo nella popolazione di replica Italiana, la differenza delle distribuzioni delle frequenze alleliche e genotipiche sono state testate mediante il test esatto di Fisher. Anche questi valori di P sono stati aggiustati con la correzione di Bonferroni. In questa popolazione la presenza di stratificazione è stata preliminarmente esclusa mediante il programma STRUCTURE (57), analizzando 53 marcatori non in linkage in 400 soggetti non correlati, selezionati dal campione delle famiglie

Italiane. I risultati indicano che il modello con un solo cluster è molto più probabile di ogni altro modello testato, il che indica che gli individui della popolazione Italiana studiati sono geneticamente omogenei.

7.10. Analisi mutazionale

Le reazioni di sequenza per la regione codificante del gene *IRAK-M* incluse le giunzioni introne/esone, sono state condotte in maniera bidirezionale utilizzando il kit “ABI PRISM® BigDye® chemistry, BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer)” secondo protocollo. La corsa elettroforetica di ciascuna sequenza è stata eseguita utilizzando un sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 Sequencer, e visualizzate mediante il software DNA Genetic Analyser (ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer Data Collection Software-Applied Biosystems, Foster City, CA). Le sequenze sono state allineate e confrontate con la sequenza consenso del gene ottenuta dallo Human Genome database (<http://genome.ucsc.edu>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

7.11. Immunoistochimica

Le biopsie del polmone sono state fissate in formalina al 10% e incluse in paraffina. Le inclusioni sono state successivamente tagliate in fettine di tessuto dello spessore di 5µm. Le fettine sono state fatte aderire su un vetrino. La deparaffinazione in xilene è stata seguita da una scala di alcoli decrescente al fine di reidratare il tessuto.

Le sezioni, sono state processate per l’immunoistochimica con i seguenti anticorpi:

- polyclonal anti-IRAK-M (Cell Signaling)
- mouse monoclonal anti–thyroid transcription factor-1 (TTF1) (Dako).

➤ mouse monoclonal anti-phospho-NF- κ B p65 (Cell Signaling).

Le immagini sono state acquisite con il microscopio LEICA DMR mediante l'utilizzo del programma Leica IM50 Image Manager v1.2 (Leica Microsystems).

La metodica impiegata negli esperimenti è quella immuno-enzimatica che prevede l'impiego di enzimi che agiscono su un substrato e originano un prodotto di reazione che a sua volta modifica una sostanza colorata (cromogeno) consentendo così di visualizzare la reazione.

La colorazione è stata eseguita con il sistema basato su avidina-streptavidina. Le sezioni di paraffina sono state incubate in successione con l'anticorpo primario non coniugato e l'anticorpo secondario coniugato con la biotina. La formazione del complesso avidina-streptavidina e il cromogeno DAB hanno permesso la rilevazione dell'interazione antigene-anticorpo.

Ringraziamenti

Voglio ricordare il Prof. Giuseppe Pilia che mi ha dato la possibilità di iniziare questo percorso, durante il quale ho potuto apprezzare la ricerca partecipando attivamente al progetto asma, da lui ideato e diretto fino alla sua prematura scomparsa nell'Aprile 2005.

Ringrazio le Dott.sse Manuela Uda e Silvia Naitza, per avermi guidato con fiducia durante questi tre anni di dottorato fino allo svolgimento della tesi, permettendomi di approfondire le mie conoscenze scientifiche; il gruppo di ricerca con cui ho collaborato per lo svolgimento di questo progetto, che mi ha trasmesso l'esperienza indispensabile per la mia formazione specifica: Lenuta Balaci, Gabriella Sole, Nazario Olla, Cristina Spada, Sabrina Pilia, Francesca Anedda, Sonia Sanna, Cristian Caria, Giuseppe Piras, e infine anche se non fanno più parte del gruppo, non dimentico Laura Loddo e Andrea Maschio.

Ancora, tutte le persone degli altri gruppi di ricerca per lo scambio di informazioni che hanno arricchito la mia cultura.

Ringrazio il Prof. Antonio Cao, per la sua preziosa guida e il continuo supporto in tutti questi anni.

Infine la mia famiglia a cui sempre sarò grata e Marco che mi è stato vicino nel raggiungimento di questo obiettivo.

BIBLIOGRAFIA

1. National Institutes of Health (1995) Global strategy for asthma management and prevention NHLBI/WHO workshop report NIH, Bethesda, MD. Publication n.95-3659,
2. Pearce N, Douwes J (2006) The global epidemiology of asthma in children. *Int J Tuberc Lung Dis* 10:125-32.
3. ISAAC (1998) Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood. Steering Committee. *Lancet* 351:1225-32.
4. Pilia G (2003) Dal fenotipo al genotipo, e viceversa, nell'era postgenomica. *Prospettive in Pediatria* 33: 159-173.
5. Laitinen T (2002) The value of isolated populations in genetic studies of allergic diseases. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology* 2:379-382
6. Cao A, Gossens M, Pirastu M (1989) Beta thalassaemia mutations in Mediterranean populations. *Br J Haematol* 71:309.
7. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Figus A, Lilliu F, De Virgiliis S, Nurchi AM, Deplano A, Moi P, et al (1999) Molecular characterization of Wilson disease in the Sardinian population—evidence of a founder effect. *Hum Mutat* 14: 294–303.
8. Cucca F, Muntoni F, Lampis R, Frau F, Argiolas L, Silvetti M, Angius E, Cao A, De Virgiliis S, Congia M (1993) Combinations of specific DRB1, DQA1, DQB1 haplotypes are associated with insulin-dependent diabetes mellitus in Sardinia. *Hum Immunol* 37:85–94.
9. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2002) National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. Available at: <http://www.ginasthma.com/>.

10. Philip J Cooper et al (2006) Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). *BMC Pulmonary Medicine* 6:24.
11. International Consensus Report on the Diagnosis and Management of Asthma.
12. Tillie-Leblond I, Iliescu C, Deschildre A (2004) Physiopathologie de la reaction inflammatoire dans l' asthma Physiopathology of inflammatory events in asthma. *Archives de pediatrie* 11:58-64.
13. Hawrylowicz C M, O'Garra A (2005): Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Review Immunology* 5:271-282.
14. WONG CK et al (2001) Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* 125:177-183.
15. Koppleman G H, Los H, Postma DS (1999) Genetic and environmental in asthma: the answer of twin studies. *Eur Respir J* 13: 2-4.
16. Rasanen M, Kaprio J, Laitnen T, Winter T, Koskenvuo M, Laitnen LA (2000) Perinatal risk factors for asthma in Finnish adolescent twins. *Thorax* 55:25-31.
17. Contopoulos-Ioannidis G, Ioanna N, Kouri J, Ioannidis PA (2007) Genetic Predisposition to Asthma and Atopy. *Respiration* 74:8-12
18. Lee JH et al (2004) ADAM33 polymorphism: association with bronchial hyper-responsiveness in Korean asthmatic. *Clinical & Experimental Allergy* 34:860-865.
19. Melen et al. (2004) Sex specific protective effects of interleukin-9 receptor haplotypes on childhood wheezing and sensitisation. *J. Med. Genetics* 41:123.

- 20.Raby et al. (2004) Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Childhood and Adult Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170:1057-1065.
- 21.Szczeklik W, Sanak M, Szczeklik A (2004) Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114: 248-253.
- 22.Romagnani S (2004) The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112:352-363.
- 23.Los H, Postmus PE, Boomsma DI (2001) Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. *Twin Research* 4:81-93.
- 24.Skadhaug LR, Christensen K, Kyvik KO, Sigsgard T (1999) Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs. *Eur Respir J* 13:8-14.
- 25.Ober et al (2006) Asthma genetics 2006: The long and winding road to gene discovery. *Genes and Immunity* 7:95–100.
- 26.Bierbaum S, Heinzman A (2007) The genetics of bronchial asthma in children. *Respiratory Medicine* 101:1369-1375.
- 27.Ober C (2005) HLA-G: An Asthma Gene on Chromosome 6p. *Immunol Allergy* 25:69-79.
- 28.Nakao et al (2001): association of INF γ and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107: 499-504.
- 29.Kere J (2005) Characterization of GPRA, a Novel G Protein–Coupled Receptor Related to Asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33:262-270.
- 30.Malerba G, Pignatti PF (2005) A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet* 46: 93-104.

31. Wills-Karp M, S L Ewart (2004) Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nature Reviews Genetics* 5: 376-387.
32. Ober C (2005) Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Human Genetics* 76:349-357.
33. Kere J (2004) Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science* 304:300–304.
34. Wjst M (2002) STAT6 as an asthma candidate gene: polymorphisms screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study. *Human Molecular Genetics* 11 6: 613–621.
35. Cookson CM (2000) A High-Density Genetic Map of the Chromosome 13q14 Atopy Locus. *Genomics* 70:286–291
36. Jang N, Stewart G and Jones G (2005) Polymorphisms within the PHF11 gene at chromosome 13q14 are associated with childhood atopic dermatitis. *Genes and Immunity* 6:262–264.
37. Keith TP et al (2002) Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418: 426–430.
38. Raby BA, Silverman EK, Lazarus R, Lange C, Kwiatkowski DJ, Weiss ST (2003) Chromosome 12q harbors multiple genetic loci related to asthma and asthma-related phenotypes. *Human Molecular Genetics* 16: 1973-1979.
39. Renauld JC (2001); New insights into the role of cytokines in asthma. *Clin. Pathol.* 54:577-589
40. Leung T et al (2005) Nitric oxide synthase polymorphisms and asthma phenotypes in Chinese children *Clinical & Experimental Allergy*, 35:1288.
41. Kobayashi K, et al (2002) IRAK-M is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Cell* 110:191-202.

- 42.Malerba G et al (2000) Linkage analysis of chromosome 12 markers in Italian families with atopic asthmatic children. *AmJ Respir Crit Care Med* 162:1587-1590
- 43.Nobutaka Suzuki, Shinobu Suzuki and Takashi Saito (2005) IRAKs: Key Regulatory Kinases of Innate Immunity. *Curr. Med. Chem.Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 4:13-20.
- 44.Mendell JT, Dietz HC (2001) When the message goes awry: disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell* 107:411–414.
- 45.Jane C. Deng, Genhong Cheng, Michael W. Newstead, Xianying Zeng, Koichi Kobayashi, Richard A. Flavell and Theodore J. Standiford (2006) Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *Clin. Invest.* 116:2532-2542
- 46.Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF (1998) Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kB, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1585-1592.
- 47.De Marco R, Locatelli F, Cerveri I, Bugiani M, Marinoni A, Giammanco G (2002) Incidence and remission of asthma retrospective study on the natural history of asthma in Italy. *J Allergy Clin Immunol* 110:228–235.
- 48.Redecke V, Hacker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, Raz E (2004) Cutting edge: activation of Toll-like receptor2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 172:2739–2743.
- 49.Balaci L, Spada MC, Olla N, Sole G, Loddo L, Anedda F, Naitza S, Zuncheddu MA, Maschio A, Altea D, Uda M, Pilia S, Sanna S, Masala M, Crisponi L, Fattori M, Devoto M, Doratiotto S, Rassu S, Mereu S, Giua E, Cadeddu NG, Atzeni R, Pelosi U, Corrias A, Perra R, Torrazza PL, Pirina P, Ginesu F, Marcias S, Schintu MG, Giacco GS, Manconi PE, Malerba G, Bisognin A, Trabetti E, Boner A, Pescollderungg L,

- Pignatti PF, Schlessinger D, Cao A, Pilia G. (2007) IRAK-M Is Involved in the Pathogenesis of Early-Onset Persistent Asthma. *Am. J Hum. Genet.* Jun 80:1103-14.
50. Wigginton JE, Abecasis GR (2005) PEDSTATS: descriptive statistics, graphics and quality assessment for gene mapping data. *Bioinformatics* 21:3445-3447.
51. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58:1347–1363.
52. Lander ES, Green P (1987). Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2363–2367.
53. Spielman, R.S., McGinnis R.E., and Ewens W.J.. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52:506-516 (1993).
54. Dudbridge F. (2003). Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25:115-21.
55. Tregouet D.A., Escolano S., Tiret L., Mallet A., Golmard J.L. (2004). A new maximum likelihood algorithm for haplotype-based association analysis: the SEM algorithm. *Ann Hum Genet*, 68: 165-177.
56. Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 21 (2), 263-265.
57. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–9.

